



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO IN VITRO COMPARATIVO DA CITOTOXICIDADE DE DOIS CIMENTOS
ENDODÔNTICOS MODIFICADOS COM CLORHEXIDINA**

Trabalho submetido por
Bernardo Maria de Bettencourt Nicolau e Lucas
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO IN VITRO COMPARATIVO DA CITOTOXICIDADE DE DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS MODIFICADOS COM CLORHEXIDINA

Trabalho submetido por
Bernardo Maria de Bettencourt Nicolau e Lucas
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Diego António Velázquez González

e coorientado por
Prof. Doutora Isabel Maria Correa Calvente de Barahona

Outubro de 2015

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer a todos os que me ajudaram e apoiaram na conclusão deste objectivo;

Ao meu orientador Prof. Doutor Diego Velázquez, pelo desafio e pelo incentivo à realização deste estudo e fornecimento de parte do material estudado.

À minha coorientadora Prof. Doutora Isabel Barahona, pela ajuda no início do trabalho no laboratório e pela disponibilidade para resolver qualquer dúvida experimental.

À Professora Susana Bandarra pelo auxílio prestado.

Ao Professor Luís Proença, pela ajuda prestada na realização da análise estatística e pela disponibilidade.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram durante toda a minha vida académica e pelo grande apoio em especial ao longo deste projeto.

Aos meus irmãos António e Martim por acreditarem em mim.

Às minhas avós, que sempre me incentivaram.

À Paula Catarina, Patrícia, Tiago, João, Vanessa, Vera, Francisca, Victor, Nádia, Nuno e todos os meus colegas que me acompanharam, ajudaram e incentivaram ao longo do curso.

À Angelus, pelo fornecimento do MTA Fillapex, um dos materiais utilizados neste estudo.

Muito obrigado a todos.

RESUMO:

Objetivo: Comparar *in vitro* o efeito citotóxico de dois cimentos endodônticos modificados com digluconato de clorhexidina em fibroblastos 3T3 de rato.

Materiais e Métodos: Formas cilíndricas com AH Plus® (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e MTA Fillapex® (Angelus, Londrina, PR, Brasil) com ou sem digluconato de clorhexidina (1%, 2% e 3%) foram incubados 24h para presa. A formação de extratos dos cimentos seguiu as normas ISO, formaram-se 11 grupos em meio de cultura durante 1 hora, 24 horas e 72 horas. Os fibroblastos 3T3 foram incubados com os extratos 24 horas. Fibroblastos em meio de cultura foram utilizados como controlo. A viabilidade celular foi medida através do ensaio do MTT. Os resultados foram analisados estatisticamente no IBM SPSS Statistics (versão 23.0) com os testes: ANOVA one-way, ANOVA one-way com correção de Brown-Forsythe e teste post-hoc Tamhane. O nível de significância foi $p < 0,001$.

Resultados: A concentração de clorhexidina parece afetar a toxicidade dos cimentos ao longo do tempo de forma diferente. Aumentar a concentração da clorhexidina diminuiu as diferenças de citotoxicidade de maneira inversamente proporcional do AH Plus nos tempos estudados. Com o MTA Fillapex ocorreu o contrário, com o aumento da concentração da clorhexidina apareceram diferenças significativas entre 1 hora e 24 horas. O próprio efeito citotóxico da clorhexidina parece ser diferente dependendo da composição do cimento.

Conclusão: Ambos os cimentos estudados são citotóxicos. O MTA Fillapex é significativamente mais citotóxico que o AH Plus. A severa citotoxicidade do MTA Fillapex mantém-se durante os tempos estudados, no entanto a citotoxicidade do AH Plus após um aumento inicial, diminuiu a partir das 24 horas. A incorporação da clorhexidina aumenta a citotoxicidade do AH Plus de forma progressiva aumentando-a mais que no MTA Fillapex.

Palavras-chave: AH Plus, clorhexidina, citotoxicidade, MTA Fillapex.

ABSTRACT:

Objective: To compare the in vitro cytotoxic effect of two endodontic sealers modified with the addition of chlorhexidine digluconate on 3T3 mouse fibroblasts.

Materials and Methods: Cylindrical specimens with AH Plus® (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) and MTA Fillapex® (Angelus, Londrina, PR, Brazil) with or without chlorhexidine digluconate (1%, 2% and 3%) were incubated for a 24 hour setting. The formation of the sealers extracts followed ISO standards, 11 groups were formed in culture medium for 1 hour, 24 hours and 72 hours. 3T3 fibroblasts were incubated with the extracts 24 hours. The fibroblasts in culture medium were used as control group. Cell viability was measured by MTT assay. The results were statistically analysed using IBM SPSS (version 23.0), with the tests: one-way ANOVA, one-way ANOVA with Brown-Forsythe correction and post-hoc Tamhane. The level of significance was $p < 0,001$.

Results: The chlorhexidine concentration seems to affect the sealers toxicity differently over time. An increase in chlorhexidine concentration decreased the differences in cytotoxicity of AH Plus inversely over time. With the MTA Fillapex the opposite occurred, with increased chlorhexidine concentration it showed significant difference from 1 hour to 24 hours. The cytotoxic effect of chlorhexidine itself seems to be different depending on the cement composition.

Conclusion: Both sealers studied are cytotoxic. MTA Fillapex is significantly more cytotoxic than AH Plus. Severe cytotoxicity of MTA Fillapex is kept during the times studied, however the cytotoxicity of AH Plus after an initial increase, decreased from 24 hours. The incorporation of chlorhexidine enhances the cytotoxicity of AH Plus progressively, increasing it more than in MTA Fillapex.

Key Words: AH Plus, chlorhexidine, cytotoxicity, MTA Fillapex

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Etiologia das lesões pulpares e periapicais	13
1.2. Tratamento endodôntico	13
1.2.1. Fases do tratamento endodôntico	14
1.2.1.1. Preparação da cavidade de acesso	14
1.2.1.2. Preparação biomecânica do sistema de condutos radiculares	14
1.2.1.2.1. Clorhexidina	15
1.2.1.2.1.1. História.....	15
1.2.1.2.1.2. Estrutura molecular	15
1.2.1.2.1.3. Mecanismo de acção	16
1.2.1.2.1.4. Aplicações em endodontia	17
1.2.1.2.1.5. Biocompatibilidade	17
1.2.1.2.1.6. Reações adversas	17
1.2.1.3. Obturação.....	18
1.3. Materiais de Obturação	18
1.3.1. Materiais de preenchimento nucleares	18
1.3.2. Cimentos de obturação	18
1.3.2.1. Cimentos resinosos	19
1.3.2.2. Cimentos à base de MTA	20
1.4. Biocompatibilidade	21
1.4.1. Definição	21
1.4.2. Materiais.....	21
1.4.3. Testes de Biocompatibilidade	22
1.4.3.1. Ensaio do MTT	23
1.5. Importância do estudo.....	23
1.6. Objetivos.....	25
1.6.1. Objetivos geral	25
1.6.2. Objetivos específicos.....	25
1.7. Hipóteses experimentais	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1. Pesquisa bibliográfica	27

2.2.	Considerações éticas	27
2.3.	Local do estudo	27
2.4.	Formação dos grupos	27
2.5.	Lista de material.....	28
2.5.1.	Reagentes biológicos.....	28
2.5.2.	Reagentes não biológicos	29
2.5.3.	Material descartável	29
2.5.4.	Equipamentos	29
2.6.	Métodos	30
2.6.1.	Preparação dos Cimentos e dos Extratos.....	30
2.6.2.	Preparação da cultura de fibroblastos 3T3	35
2.6.3.	Determinação da viabilidade celular	37
2.6.4.	Ensaio do MTT.....	38
2.7.	Critérios de avaliação.....	39
2.8.	Análise Estatística.....	40
3.	RESULTADOS	41
3.1.	Análise por grupos	41
3.2.	Análise por tempo de envelhecimento	43
3.3.	Análise por tempos de envelhecimento para cada grupo.....	49
4.	DISCUSSÃO.....	51
5.	CONCLUSÃO	61
6.	BIBLIOGRAFIA.....	63
7.	ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do digluconato de clorhexidina (“Estrutura molecular do digluconato de cloroheixidina,” n.d.)	16
Figura 2 - Pirâmide de teste dos materiais (Wataha, 2012).....	22
Figura 3 - AH Plus (Dentsply DeTrey®, Konztañz, Alemanha)	30
Figura 4 - MTA Fillapex (Angelus®, Londrina, PR, Brasil)	31
Figura 5 - Molde de fabricação dos discos de cimento	32
Figura 6 - Exemplo da preparação dos cimentos – AH Plus e Clorhexidina 3%	32
Figura 7 - Grupos dos cimentos e da clorhexidina preparados em meio (ex. Ensaio – 1 hora).....	33
Figura 8 - Placa de 96 poços preparada com as células 3T3 (ex. Ensaio – 1 hora).....	34
Figura 9 - Imagem das células 3T3 com uma confluência de 80% ao microscópio ótico invertido - objetiva 10x	35
Figura 10 - Frasco de cultura de 25 cm ² com células 3T3	36
Figura 11 - Redução do MTT em formazan (Riss <i>et al.</i> , 2013)	37
Figura 12 - Esquema ilustrativo do ensaio de redução do MTT	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de estudo, segundo o cimento endodôntico e a concentração de clorhexidina	27
Tabela 2 - Cimentos utilizados e a sua composição (informação dos manuais de utilização das embalagens dos produtos)	31
Tabela 3 - Tempos de envelhecimento e meio de cultura utilizado para formação dos extratos	33
Tabela 4 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm DP (representando a percentagem de viabilidade celular), por grupos	41
Tabela 5 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular), dos grupos com tempo de envelhecimento de 1 hora	43
Tabela 6 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular), dos grupos com tempo de envelhecimento de 24 horas	45
Tabela 7 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular), dos grupos com tempo de envelhecimento de 72 horas	47
Tabela 8 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular dos grupos por tempo de envelhecimento)	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular por grupos	42
Gráfico 2 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular referentes aos grupos do ensaio com tempo de envelhecimento de 1 hora	44
Gráfico 3 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular referentes aos grupos do ensaio com tempo de envelhecimento de 24 horas.....	46
Gráfico 4 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular referentes aos grupos do ensaio com tempo de envelhecimento de 72 horas.....	48
Gráfico 5 - Distribuição das percentagens médias de viabilidade celular referentes aos grupos do estudo ao longo da 1 hora, 24 horas e 72 horas	50

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
°F	Grau Fahrenheit
3T3	Células NIH/3T3
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANSI/ADA	Instituto Americano Nacional de Padronização/ Associação Americana Dentária
ATCC	Coleção de Culturas do Tipo Americano
CHX	Digluconato de Clorhexidina
CO₂	Dióxido de Carbono
Cr	Crômio
CS	Silicato de Cálcio
CVDE	Teste de Exclusão do Corante Violeta Cristal
DMEM	Meio Eagle Dulbecco Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAA	Associação Americana de Endodontia
ESE	Sociedade Europeia de Endodontia
FBS	Soro Bovino Fetal
ISO	Organização Internacional para Padronização
MEM	Solução Aminoácido não-essencial MEM
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
M	Unidade de Molar
mM	Unidade de Milimolar
mL	Mililitro
MTA	Trióxido Agregado Mineral
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NAC	Ácido Nucleico Total
NBT	Nitroazul de Tetrazólio
nm	Nanómetro
NR	Vermelho Neutro
NRU	Captação de Corante Vermelho Neutro
PBS	Tampão fosfato
PNA	Solução de Piruvato de Sódio
PTS	Sistema Fosfotransferase de Açúcar
WST	Tetrazólio Solúvel em Água
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etiologia das lesões pulpares e periapicais

Endodontia é a especialidade em medicina dentária que diz respeito à prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças ou lesões da polpa dentária. A polpa é o tecido mole dentro do dente que contém nervos e vasos sanguíneos e é responsável pelo desenvolvimento dos dentes. O tratamento endodôntico é um meio seguro e eficaz de recuperar peças dentárias que de outra forma seriam perdidas (Glickman & Vogt, 2011).

A principal etiologia da patologia pulpar e periapical é de origem bacteriana (Takehashi, Stanley, & Fitzgerald, 1966; Möller, Fabricius, Dahlén, Ohman, & Heyden, 1981). Quando a polpa é agredida de forma irreversível, inflama e eventualmente necrosa. As causas mais frequentes de morte pulpar são cáries extensas, restaurações profundas, trauma, fissuras nos dentes, e doença periodontal ou gengival. Quando a polpa é exposta a bactérias a partir de cáries ou saliva que se vazou para a câmara pulpar, a infecção pode ocorrer no espaço pulpar e, se não for tratada, evolui para a doença periapical. Sem tratamento endodôntico, o dente acabará por ter de ser removido (Glickman & Vogt, 2011).

1.2. Tratamento endodôntico

O Guia para Endodontia Clínica da Associação Americana de Endodontia (EAA) descreve o tratamento endodôntico contemporâneo como o tratamento não cirúrgico dos canais radiculares dos dentes permanentes que envolve o uso de produtos químicos biologicamente aceitáveis e tratamento mecânico do sistema de canais radiculares para promover a cicatrização e reparação dos tecidos periapicais. O processo é realizado sob condições assépticas com isolamento absoluto (Johnson & C. Kulild, 2011).

Após a limpeza e preparação do sistema de canais, este é complementado com o seu completo preenchimento tridimensional mediante um material biocompatível e dimensionalmente estável. Os materiais de obturação classificam-se em materiais de preenchimento nucleares e os cimentos de obturação. Independentemente do material nuclear utilizado, o cimento é essencial para uma correcta obturação. O cimento vai preencher os espaços entre os cones de gutta-percha e as paredes do sistema de canais, e também os espaços entre os cones utilizados na obturação (Yilmaz, Dogan, Ozdemir, & Serper, 2012).

O objetivo do diagnóstico é determinar o problema que o doente tem, e a sua causa. Que vai estar diretamente relacionado com o tratamento, se este for mesmo necessário. Começando pela anamnese, o diagnóstico baseia-se no exame físico tanto intraoral como extraoral (inspeção, palpação, percussão e mobilidade dentária) do doente e auxiliados por exames complementares como os diferentes testes térmicos, elétricos, cavitários, provas de vitalidade pulpar, radiografias, anestesia, transiluminação, entre outros (Berman & Hartwell, 2011).

1.2.1. Fases do tratamento endodôntico

De acordo com as diretrizes de qualidade para o tratamento endodôntico da Sociedade Europeia de Endodontia (ESE), o tratamento endodôntico é realizado quando a polpa está não-vital ou foi removida para prevenir ou tratar periodontite apical (European Society of Endodontology, 2006).

1.2.1.1. Preparação da cavidade de acesso

O acesso é das fases mais importantes do tratamento endodôntico não cirúrgico. A preparação adequada da cavidade de acesso é essencial para um bom resultado endodôntico. Caso contrário, os instrumentos e materiais tornam-se difíceis de usar adequadamente no sistema de canal radicular altamente complexo e variável (Vertucci & Haddix, 2011).

1.2.1.2. Preparação biomecânica do sistema de condutos radiculares

Após uma adequada determinação do comprimento de trabalho, inicia-se a instrumentação, cujos objetivos são: remover o tecido pulpar remanescente, eliminar microrganismos, remover detritos e conformar o(s) canal ou canais da raiz para que o sistema de canais radicular possa ser limpo e preenchido. O uso de ampliação e outras fontes de luz facilitam a identificação da anatomia dos canais radiculares. Os requisitos devem ser: o canal preparado deve incluir o canal original, a constrição apical deve ser mantida, o canal deve terminar num estreitamento apical e do canal deve ser afunilado da coroa ao ápice. A preparação deve ser feita com irrigação abundante. O comprimento final da preparação não deve ser reduzido por tratamento (European Society of Endodontology, 2006).

A preparação deve ser feita com irrigação abundante. Os objetivos da irrigação são: eliminar microrganismos, remover os detritos, lubrificar os instrumentos endodônticos e

dissolver restos orgânicos. A solução irrigante deve ter preferencialmente propriedades desinfetantes e de dissolução de detritos orgânicos, sem irritar os tecidos periapicais. A solução irrigante deve ser usada em grandes quantidades, o mais dentro do canal quanto possível, sem correr o risco de extrusão para além do forâmen (European Society of Endodontology, 2006).

A solução irrigante mais comumente utilizada é o hipoclorito de sódio. No entanto, a clorhexidina na forma líquida tem sido recomendada como uma solução irrigante (Metzger, Basrani, & Goodis, 2011).

1.2.1.2.1. Clorhexidina

1.2.1.2.1.1. História

A clorhexidina foi desenvolvida há mais de 50 anos pela *Imperial Chemical Industries* em Inglaterra e apareceu no mercado no Reino Unido em 1953 como um creme antisséptico. Desde 1957 que tem sido utilizada para desinfeção e tratamento da pele, olhos, e infeções na garganta em ambos homens e animais (Metzger *et al.*, 2011). Apesar de a clorhexidina ter começado a ser utilizada para controlar a placa bacteriana em 1959, o seu uso apenas se generalizou em Medicina Dentária na década de 1970 após a publicação dos estudos por Løe e Schiøtt (Løe, Rindom Schiøtt, Glavind, & Karring, 1976; Løe & Rindom Schiøtt, 1970). A clorhexidina é atualmente considerada o *gold standard* de antissépticos orais e é, juntamente com flúor, o agente de prevenção mais extensamente estudado em Medicina Dentária. Tem sido usada na endodontia como irrigante ou medicamento intracanal sozinho ou em combinação com hidróxido de cálcio, entre outras utilizações (Gomes *et al.*, 2013).

1.2.1.2.1.2. Estrutura molecular

O gluconato de clorhexidina também é chamado de digluconato de clorhexidina (figura 1) ou simplesmente clorhexidina (Gomes *et al.*, 2013). O sal digluconato de clorhexidina é facilmente solúvel em água (Metzger *et al.*, 2011). A clorhexidina pertence à família das bis-biguanidas, consiste em dois anéis de quatro - clorofenil simétricos e dois grupos bisguanida ligados por uma cadeia central de hexametileno. É uma molécula fortemente básica e é estável como um sal. A clorhexidina tem sido utilizada em várias formas desde gluconato, acetato ou hidrocloreto (Leonardo *et al.*, 1999). O digluconato de clorhexidina

é a preparação mais comum devido à sua estabilidade e alta solubilidade em água (Basrani, 2005).

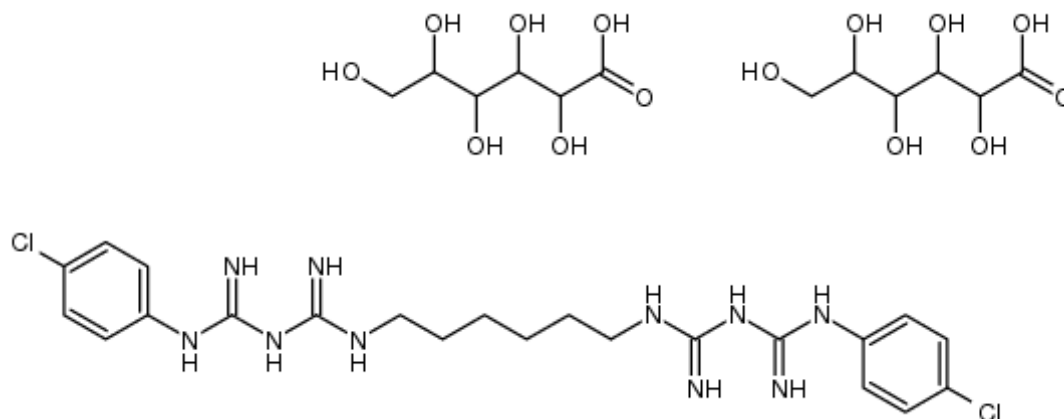


Figura 1 - Estrutura molecular do digluconato de clorhexidina (“Estrutura molecular do digluconato de clorhexidina,” n.d.)

1.2.1.2.1.3. Mecanismo de acção

A clorhexidina é um agente antimicrobiano de largo espectro, é ativo contra bactérias Gram + e Gram – e também leveduras, sendo um agente antifúngico eficaz contra a *Candida albicans* (Mohammadi & Abbott, 2009). Devido à sua natureza catiónica é capaz de se ligar às superfícies das bactérias, danificando as suas paredes e tornando-as permeáveis. Dependendo da sua concentração, a clorhexidina pode ter ambos os efeitos: bacteriostáticos e bactericidas. Em altas concentrações atua como um detergente (por danificar a membrana celular, provoca a libertação do citoplasma) e exerce um efeito bactericida. Em baixas concentrações é bacteriostática (permitindo a passagem de substâncias de baixo peso molecular através da membrana celular), sem danificar as células irreversivelmente. A clorhexidina também pode afetar o metabolismo bacteriano de várias outras maneiras, tais como a supressão do sistema fosfotransferase de açúcar (PTS) e inibir a atividade de transporte de produção de ácidos em algumas bactérias (Metzger *et al.*, 2011).

1.2.1.2.1.4. Aplicações em endodontia

A clorhexidina tem sido muito estudada como um irrigante endodôntico e medicação intracanal, tanto *in vivo* como *in vitro* (Metzger *et al.*, 2011). *In vitro*, tem tão boa ou melhor eficácia antimicrobiana que o hidróxido de cálcio (Siqueira & de Uzeda, 1997). Nomeadamente, a clorhexidina a 2% é bastante eficaz na eliminação de biofilmes de *E. faecalis* (Lima, Fava, & Siqueira, 2001). *In vivo* inibe a inflamação de reabsorção radicular externa induzida experimentalmente quando aplicada durante 4 semanas. Em canais radiculares infetados, reduz as bactérias de forma tão eficaz como o hidróxido de cálcio, quando aplicado durante 1 semana. Ao contrário do hidróxido de cálcio, a clorhexidina tem substantividade, e se a sua atividade antimicrobiana for transmitida para a dentina radicular, tem o potencial de prevenir a colonização bacteriana das paredes dos canais por períodos de tempo prolongados (Metzger *et al.*, 2011). A clorhexidina tem uma substantividade na dentina até 12 semanas (Mohammadi & Abbott, 2009). Este efeito depende da concentração da clorhexidina, mas não do seu modo de aplicação, que pode ser líquido, gel ou por dispositivos de libertação controlada (Metzger *et al.*, 2011).

1.2.1.2.1.5. Biocompatibilidade

Segundo Mohammadi (2009), a biocompatibilidade da clorhexidina é aceitável.

Num estudo de Ribeiro *et al.* (2005) avaliou-se a genotoxicidade, ou seja o dano potencial ao ADN de vários compostos incluindo o formocresol, paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio e digluconato de clorhexidina em células de ovários de hamster chinês. O digluconato de clorhexidina foi testado em concentrações de 0,01% a 1%. Os seus resultados mostraram que nenhum destes agentes causou dano ao ADN (Ribeiro *et al.*, 2005).

1.2.1.2.1.6. Reações adversas

A clorhexidina, apesar de ser considerada como uma solução relativamente segura, pode induzir reações alérgicas (Metzger *et al.*, 2011; Mohammadi & Abbott, 2009).

Em cerca de 2% dos doentes foi detetada sensibilidade à clorhexidina (Krauthaim, Jermann, & Bircher, 2004). Um caso de choque anafilático foi relatado após a aplicação de 0,6 % de CHX na pele intacta que apresentavam sinais de uma erupção na sequência de um acidente menor. Outras reações alérgicas tais como anafilaxia, dermatite de contato, e urticária foram relatadas após contato direto com tecido da mucosa ou feridas

abertas. Não há publicações que relatem reações alérgicas após irrigação do canal radicular com clorhexidina (Metzger *et al.*, 2011).

1.2.1.3. Obturação

O Guia para Endodontia Clínica da EAA diz em relação à obturação que, os cimentos endodônticos são utilizados em conjunto com um material obturador semissólido ou sólido biologicamente aceitável para estabelecer uma vedação adequada do sistema de canal radicular (Johnson & C. Kulild, 2011).

1.3. Materiais de Obturação

1.3.1. Materiais de preenchimento nucleares

Embora uma variedade de materiais de preenchimento nucleares tenha sido utilizada em conjunto com um cimento, o método mais comum de obturação envolve a gutta-percha, como material nuclear (Limkangwalmongkol, Abbott, & Sandler, 1992).

1.3.2. Cimentos de obturação

Os cimentos endodônticos são necessários para selar o espaço entre as paredes dentinárias dos canais e o núcleo de obturação, como a gutta-percha. Os cimentos preenchem os espaços e irregularidades nos canais radiculares, e os espaços entre os cones de gutta-percha. Os cimentos também servem como lubrificantes durante o processo de obturação (Limkangwalmongkol *et al.*, 1992; Yilmaz *et al.*, 2012).

Grossman (1988) identificou as propriedades do cimento ideal, no entanto atualmente nenhum cimento reúne todos estes requisitos:

1. Ter aderência quando misturados para proporcionar uma boa adesão entre ele e a parede do canal após presa;
2. Estabelecer um selamento hermético;
3. Ser radiopaco, de modo que possa ser visto na radiografia;
4. Pó muito fino, de modo que se possa misturar facilmente com líquido;
5. Sem contração após presa;
6. Sem causar coloração da estrutura dentária;
7. Bacteriostático, ou pelo menos não incentivar o crescimento bacteriano;
8. Tempo de presa lento;
9. Insolúvel nos fluídos dos tecidos;

10. Tolerável pelos tecidos, ou seja, não irritante para o tecido periradicular;
11. Solúvel em um solvente comum se for necessário para remover a obturação do canal radicular (Grossman *et al.*, 1988).

Os cimentos endodônticos devem ser biocompatíveis e bem tolerados pelos tecidos periapicais (Yilmaz *et al.*, 2012).

Todos os cimentos endodônticos exibem toxicidade quando recém misturados; no entanto, a sua toxicidade é grandemente reduzida após presa. Os cimentos são reabsorvíveis quando expostos a tecidos e fluídos dos tecidos. A cicatrização e reparação tecidual geralmente parecem não ser afetados pela maioria dos cimentos, desde que não existam produtos de degradação adversos no cimento ao longo do tempo (Johnson & C. Kulild, 2011).

O contacto dos cimentos endodônticos com os tecidos moles e duros circundantes estabelece-se por longos períodos de tempo (Hegde, Rodrigues, Kumari, & Hegde, 2011). No canal radicular, o cimento pode ser exposto a fluídos e exsudados dos tecidos, de modo que as substâncias de produtos de degradação ou de corrosão possam ganhar acesso aos tecidos periradiculares, podendo ter efeitos adversos sobre a capacidade proliferativa das células periapicais (Karapinar-Kazandağ *et al.*, 2011).

Os cimentos não devem ser rotineiramente colocados em contacto com os tecidos periapicais como parte de uma técnica de obturação (Briseno & Willershausen, 1991, 1992; Ørstavik, 2005). No entanto, apesar de os cimentos deverem ficar apenas dentro do canal, a extrusão para os tecidos periradiculares pode ocorrer (Karapinar-Kazandağ *et al.*, 2011).

Os cimentos endodônticos dividem-se em várias categorias consoante o seu componente principal. Existem cimentos com várias formulações e as mais utilizadas são as com óxido de zinco eugenol, cimentos de hidróxido de cálcio, ionómero de vidro e resinosos. Todos eles exibem toxicidade até à presa. Portanto, deve ser evitada a extrusão de cimento para os tecidos periapicais (Johnson & C. Kulild, 2011).

1.3.2.1. Cimentos resinosos

Os cimentos resinosos têm sido utilizados há bastante tempo, devido às suas capacidades de adesão e não conterem eugenol (Johnson & C. Kulild, 2011). A popularidade destes cimentos está a aumentar apesar da sua bem documentada toxicidade e mutagenicidade

(Chang, Lee, Kang, Kum, & Kim, 2014). Antes da formulação do AH Plus, a fórmula utilizada era a do AH 26® (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) que era um cimento de presa lenta mas que foi descoberto que libertava formaldeído após presa. O AH Plus, fórmula modificada do AH 26, é muito utilizado em endodontia, apresenta bom selamento, radiopacidade, é fácil de manusear, tem boa resistência, estabilidade dimensional, alta fluidez, e baixa solubilidade, além de uma boa adesão às paredes do canal radicular. Tem biocompatibilidade satisfatória, apesar de induzir uma ligeira reação inflamatória inicial nos tecidos circundantes. Esta característica pode estar relacionada, quer com a libertação de formaldeído durante a polimerização ou pela libertação de um componente citotóxico, como o bisfenol A, que está presente na sua composição (Miletić *et al.*, 2005). O AH Plus, para além das características já referidas, ainda possui segundo o fabricante propriedades de selamento de longa duração, grande estabilidade dimensional, propriedades autoadesivas. É um cimento indicado para a obturação permanente de canais radiculares na dentição permanente em combinação com cones de obturação.

As suas propriedades antimicrobianas mostraram ser ativas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus epidermidis*. (Leonardo, da Silva, Tanomaru Filho, Bonifácio, & Ito, 2000). No estudo realizado por Gonçalves (2015), concluiu que a adição de clorhexidina aos cimentos AH Plus e MTA Fillapex aumentam a capacidade antimicrobiana sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* (Gonçalves, 2015).

1.3.2.2. Cimentos à base de MTA

O pH do MTA foi determinado como 12,5 após presa, que é comparável com o do hidróxido de cálcio. A biocompatibilidade do MTA, baixa citotoxicidade, propriedades antimicrobianas, baixa infiltração, e sua capacidade para tomar presa na presença de sangue ou humidade estão entre as vantagens adicionais do material (Emmanuel J. N. L. Silva *et al.*, 2013).

Em 1999, Holland *et al.* sugeriram o uso do cimento de MTA como um material de preenchimento. No entanto, todas as propriedades e atividades descritos por eles referem-se ao cimento de MTA branco, que tem características físicas insatisfatórias quando usado como um cimento endodôntico (Holland *et al.*, 1999).

O MTA Fillapex é um cimento composto por MTA, resina salicilato, resina natural, óxido de bismuto e sílica. Segundo o fabricante tem fácil manipulação, bom tempo de trabalho e baixa solubilidade, fazendo o selamento através da expansão após presa. Este cimento, para além das características já referidas, devido à sua composição possui ainda as seguintes características:

- É indicado para a obturação de canais radiculares na dentição permanente em combinação com materiais de selamento endodôntico;
- Alta radiopacidade;
- Baixa expansão de presa;
- Baixa solubilidade em contacto com fluídos tissulares;
- Excelente viscosidade para obturação de canais radiculares;
- Não mancha a estrutura dentária;
- Não contém eugenol, não interferindo com materiais de restauração;
- Está contraindicado em casos de hipersensibilidade a resinas ou a outros componentes do produto.

1.4. Biocompatibilidade

1.4.1. Definição

A definição de biocompatibilidade tem estado em constante evolução e foi enunciada por Williams do seguinte modo:

Biocompatibilidade refere-se à capacidade do biomaterial para executar a sua função desejada no que diz respeito a uma terapia médica, sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistémicos indesejáveis no recipiente ou beneficiário da terapia, mas gerar a resposta celular ou tecidual mais apropriada nessa situação específica, e otimizar o desempenho clinicamente relevante dessa terapia (Williams, 2008, p. 2951).

1.4.2. Materiais

Segundo Wataha, existe um paradigma clássico para avaliação da biocompatibilidade de novos materiais. Primeiro, os materiais têm de passar os testes *in vitro*, depois os testes em animais e muito poucos chegam a utilização clínica, como se pode ver na figura 2. Apenas os materiais que têm bons testes clínicos são introduzidos para o uso público. Isto foi desenhado para avaliar grandes números de materiais, mantendo a viabilidade ética e

económica e limitando a potencial dor ou sofrimento dos animais e humanos (Wataha, 2012).

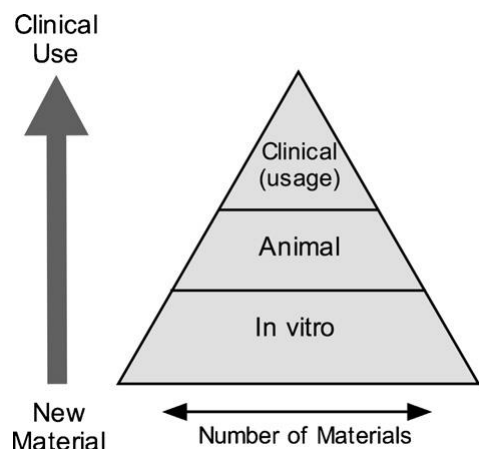


Figura 2 - Pirâmide de teste dos materiais (Wataha, 2012)

1.4.3. Testes de Biocompatibilidade

A resposta biológica aos materiais dentários pode ser medida de várias maneiras, mas é aconselhado começar por fazer testes *in vitro* (Wataha, 2012).

Os testes de biocompatibilidade de materiais *in vitro* ocorrem fora dos organismos vivos, ou seja, são realizados utilizando culturas de células. O uso deste método permite avaliar o efeito dos materiais na função celular, na sua viabilidade, na expressão génica ou proteica, nos mediadores da inflamação, no tipo de morte celular, na morfologia celular, entre outros. Além disso, possuem bastantes vantagens, como a grande reprodutibilidade, rapidez, baixo custo, e facilidade na determinação dos grupos de controlo além de evitar conflitos legais e éticos, como por exemplo, a utilização direta dos materiais em animais ou humanos, com os riscos associados (De Souza Costa *et al.*, 2014).

Os testes *in vitro* são distintos dos testes *ex vivo* porque este último utiliza um tecido ou órgão, que é mantido durante um curto período de tempo (geralmente <24 h) num recipiente de cultura (Wataha, 2012) e depois novamente introduzidos no organismo.

Existem vários testes de citotoxicidade, mas os métodos mais utilizados são os que determinam a viabilidade celular, através da análise da atividade mitocondrial das células expostas ao material e/ou aos seus componentes isolados (De Souza Costa *et al.*, 2014).

Os ensaios que fornecem informação útil sobre as funções celulares incluem a redução do sal de tetrazólio através do ensaio do MTT, a captação de corante vermelho neutro

(NRU) e o ácido nucleico total (NAC) (Lovschall, Eiskjaer, & Arenholt-Bindslev, 2002; Osorio, Hefti, Vertucci, & Shawley, 1998).

1.4.3.1. Ensaio do MTT

O ensaio do Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), desenvolvido por Mosmann, é um ensaio colorimétrico, versátil e quantitativo que mede apenas a atividade dos enzimas presentes nas células vivas e pode ser lido rapidamente num leitor ELISA (Mosmann, 1983).

O MTT é reduzido por todas as células vivas e metabolicamente ativas e convertido em formazan. A quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células vivas. A principal vantagem deste ensaio colorimétrico é a velocidade com a qual as amostras podem ser processadas (Mosmann, 1983).

Este ensaio é frequentemente utilizado em vários estudos para medir e comparar a citotoxicidade de cimentos endodônticos (Accardo, Himel, & Lallier, 2014; Chang *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

1.5. Importância do estudo

Já foram realizados estudos onde foi feita a incorporação de digluconato de clorhexidina a 1% e 2% no cimento endodôntico AH Plus, mas com o objectivo de avaliar a atividade antimicrobiana e a capacidade de inibição da formação de biofilmes do *Enterococcus faecalis*. Verificou-se que de facto aumentou o poder bactericida e a capacidade de inibição de formação de biofilmes do *Enterococcus faecalis* (Bailón-Sánchez, Baca, Ruiz-Linares, & Ferrer-Luque, 2014). Também já se verificou num outro estudo que a mistura de clorhexidina a 1% e 2% no cimento endodôntico AH Plus não alterou as suas propriedades físicas dentro dos limites do Instituto Americano Nacional de Padronização/ Associação Americana Dentária (ANSI/ADA) para cimentos endodônticos (Ruiz-Linares, Bailón-Sánchez, Baca, Valderrama, & Ferrer-Luque, 2013). No entanto, não existem estudos semelhantes onde sejam avaliadas as alterações na citotoxicidade de cimentos endodônticos com várias concentrações de digluconato de clorhexidina, já que estes têm de ser biocompatíveis antes da sua implementação clínica.

Por estes motivos com o intuito de melhorar a capacidade antimicrobiana de diferentes cimentos, a clorhexidina tem sido frequentemente incorporada em diferentes materiais em medicina dentária e testados os seus efeitos. Já foi incorporada em cimentos de

ionómero de vidro (Imazato, 2009; Türkün, Türkün, Ertuğrul, Ateş, & Brugger, 2008; Tüzüner *et al.*, 2011), mas também cimentos endodônticos (Bailón-Sánchez *et al.*, 2014).

Num estudo de Imazato (2009), feito com a incorporação de clorhexidina em cimentos de ionómero de vidro, conclui-se que a incorporação de diacetato de CHX a 2% ou superior (3%) diminuía significativamente a resistência à compressão e força adesiva, prejudicando a união à dentina. Concluiu-se que, a incorporação de diacetato de CHX a 1% seria ideal para o uso clínico, em termos de atividade antibacteriana, de perfil de libertação do agente, propriedades físicas e capacidade de adesão a substratos do dente. Noutro estudo revelou com um ensaio clínico, benefícios na utilização de um cimento de ionómero de vidro contendo CHX para combater eficazmente a infecção residual no tratamento restaurador atraumático (Imazato, 2009).

Num outro estudo, realizado por Tüzüner *et al.* (2011), avaliou-se atividade antibacteriana, números de microdureza, e padrões de fluoreto acumulado libertado dos CIV convencionais contendo misturas de diacetato de clorhexidina / cetrimida. Concluiu-se que esta adição pode ter um efeito antibacteriano contra as bactérias *S. mutans* e *L. casei* até 90 dias sem deteriorar seriamente a dureza superficial e as propriedades de libertação de flúor. Estas combinações podem ser uma alternativa para os procedimentos de tratamento restaurador atraumático proporcionando efeitos antibacterianos benéficos (Tüzüner *et al.*, 2011).

O estudo de Türkün *et al.* (2008) testou se diacetato de clorhexidina ou digluconato de clorhexidina acrescentado a um cimento de ionómero de vidro tinha qualquer efeito antibacteriano a longo prazo contra certas bactérias orais e testou também as propriedades físicas destas novas formulações. Concluiu que a incorporação de digluconato de CHX líquido no cimento de ionómero de vidro ou o diacetato de CHX no pó do material tem a capacidade de proporcionar um efeito antimicrobiano de longo prazo sobre *S. mutans* e *L. acidophilus* e apenas em alguns grupos do cimento houve menor resistência à compressão dos materiais, as restantes propriedades físicas não foram comprometidas (Türkün *et al.*, 2008).

Baseados nos antecedentes previamente citados, foram propostos os objetivos deste trabalho de tese de mestrado que são descritos na continuação.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivos geral

O objetivo deste estudo é avaliar *in vitro* o efeito citotóxico de dois cimentos endodônticos modificados pela adição de digluconato de clorhexidina.

1.6.2. Objetivos específicos

Os objetivos deste estudo são medir e comparar a percentagem de células vivas após contacto com os extratos de dois cimentos endodônticos, o AH Plus e o MTA Fillapex, modificados ou não, com a adição de digluconato de clorhexidina em três concentrações diferentes (1%, 2% e 3%), após o seu envelhecimento durante vários períodos de tempo (1 hora, 24 horas e 72 horas). Foram utilizadas células da linha celular 3T3 de rato para o ensaio da viabilidade celular, MTT.

1.7. Hipóteses experimentais

Hipótese nula:

Não há diferenças de viabilidade dos fibroblastos 3T3 quando em contacto com os cimentos AH Plus e MTA Fillapex com ou sem digluconato de clorhexidina a 1%, 2% e a 3%.

Hipótese alternativa:

Há diferenças de viabilidade dos fibroblastos 3T3 quando em contacto com os cimentos AH Plus e MTA Fillapex com ou sem digluconato de clorhexidina a 1%, 2% e a 3%.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Pesquisa bibliográfica

A revisão da literatura científica relacionada com esta tese baseou-se na consulta de fontes secundárias, mas sobretudo primárias como o PUBMED/MEDLINE tendo como critérios principais os termos em inglês: *AH Plus*, *clorhexidine*, *citotoxicity*, *MTA Fillapex*. Estabeleceu-se um limite temporal de 5 anos e sem limite linguístico. Rejeitaram-se os artigos não relacionados com o tema e aqueles sem resumo em inglês. A partir do material encontrado foram também consultadas outras fontes.

2.2. Considerações éticas

Esta tese de mestrado teve a aprovação da Comissão de Ética do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e o documento de aprovação encontra-se nos anexos.

2.3. Local do estudo

Este trabalho de tese de mestrado realizou-se no Departamento de Medicina Dentária Conservadora: Endodontia e com a colaboração do Departamento de Biologia Celular e Molecular que incluiu os laboratórios da cultura de células do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

2.4. Formação dos grupos

Os grupos utilizados neste estudo estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos de estudo, segundo o cimento endodôntico e a concentração de clorhexidina

Grupos	Cimentos e Clorhexidina
A	AH Plus
B	MTA Fillapex
C	AH Plus + CHX 1%
D	AH Plus + CHX 2%
E	AH Plus + CHX 3%
F	MTA Fillapex + CHX 1%
G	MTA Fillapex + CHX 2%
H	MTA Fillapex + CHX 3%
I	CHX 1%
J	CHX 2%
K	CHX 3%

2.5. Lista de material

2.5.1. Reagentes biológicos

- a) Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT); 99% puro (Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido) – M5655
- b) Células NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™ American Type Culture Collection®, Manassas, EUA)
- c) Dimetilsulfóxido (DMSO); filtrado esterilizado (Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido) – D2650
- d) *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio Eagle Dulbecco Modificado, DMEM); filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas (Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido) – D5671
- e) *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (Tampão fosfato, PBS) 10x;pH 6,0-7,0 (Gibco, Londres, Reino Unido) – 14200-059
- f) *Fetal Bovine Serum Gold* (Soro Bovino Fetal, FBS); esterilizado; pH 7,1; testado para endotoxinas e hemoglobina (PAA, Pasching, Áustria) – A11-151
- g) Gentamicina 50 mg/mL (Gibco, Londres, Reino Unido) – 15750-037
- h) *MEM Non-essential Amino Acid Solution* (Solução Aminoácida não-essencial MEM) 100x; filtrado esterilizado; testado para endotoxinas (Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido) – M7145
- i) Solução de Azul Tripán (0,4%); filtrado esterilizado (Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido) – T8154
- j) Solução de anfoterizina B 250 µg/mL (Fungizona); filtrado-esterilizado (Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido) – A2942
- k) Solução de digluconato de clorhexidina (20%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) - C9394
- l) Solução de Piruvato de Sódio 100 mM (PNA) (Gibco, Londre, Reino Unido) – 11360-039
- m) Solução L-glutamina-penicilina-estreptomicina (29.2 mg L-glutamina, 10000 U/mL Penicilina, 10 mg/mL Estreptomicina); filtrada-esterilizada (Gibco, Londres, Reino Unido) – 10378-016

- n) Tripsina de pâncreas suíno; filtrado-esterilizado; pH 6,4-7,0 (Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido) – 15090-046

2.5.2. Reagentes não biológicos

- a) AH Plus® (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha)
- b) MTA Fillapex® (Angelus, Londrina, PR, Brasil)
- c) Putty Normosil® (Normon, Madrid, Espanha)

2.5.3. Material descartável

- a) Criotubo (Nunc®, Nova Iorque, EUA)
- b) Filtros de 0,45 µm (Whatman®, Nova Jersey, EUA) - G5444158
- c) Frasco de cultura de 25 cm² (Sarstedt®, Nümbrecht, Alemanha)
- d) Papel encerado da embalagem dos cimentos
- e) Placas de 96 poços (VWR International®, Xangai, China)
- f) Placas de Petri para cultivo celular 40 mm (VWR International®, Xangai China)
- g) Tubos tipo Falcon cónicos 15 mL (Dentalab™, Madrid, Espanha)

2.5.4. Equipamentos

- a) Balança M-Power mod.AZ214 (Sartorius™, Goettingen, Alemanha)
- b) Câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene™, Lyngby, Dinamarca)
- c) Câmara fotográfica do Samsung GT - I9505 - 13 Mp (Samsung®, Seul, Coreia do Sul)
- d) Centrifugadora 3-16PK (Sigma®, Londres, Reino Unido)
- e) Espátula de metal (Asa Dental, Luca, Itália)
- f) Incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO₂ Water Jacketed (Shel Lab™, Cornelius, EUA)
- g) Leitor de microplacas Model 680 (Bio-Rad®, Califórnia, EUA)
- h) Micropipetas p10, p100 e p1000 (Gilson®, Middleton, EUA)
- i) Microscópio ótico invertido (Axiovert® 25, Zeiss, EUA)
- j) Pipeta multicanal BPE-300 (Labnet International®, Nova Jersey, EUA)
- k) Placa de Neubauer (modelo 8100104 - Hirschmann Neubauer-improved®, Estugarda, Alemanha)

- 1) IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®, versão 23.0, Nova Iorque, EUA)

2.6. Métodos

A manipulação dos cimentos endodônticos, das células e do meio de cultura foram realizados em câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 em condições de assepsia. Os materiais utilizados durante este estudo estavam estéreis ou foram esterilizados no laboratório em autoclave a 120°C (graus Celsius) durante 30 minutos.

2.6.1. Preparação dos Cimentos e dos Extratos

Foram utilizados dois tipos diferentes de cimentos endodônticos: o AH Plus e o MTA Fillapex. (figura 3, figura 4 e tabela 2). Ambos os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante, sobre papel encerado fornecido pelo mesmo, utilizando espátulas de metal esterilizadas (autoclavadas). Para o AH Plus, foram misturados volumes iguais (1:1) da pasta A e pasta B em placa de vidro ou no papel de mistura fornecido com a embalagem. Misturou-se até se obter consistência homogênea. Para o MTA Fillapex, foram doseadas em quantidades iguais (1:1) as pastas e espatuladas 30 segundos para homogeneizar a mistura.



Figura 3 - AH Plus (Dentsply DeTrey®, Konz, Alemanha)



Figura 4 - MTA Fillapex (Angelus®, Londrina, PR, Brasil)

Tabela 2 - Cimentos utilizados e a sua composição (informação dos manuais de utilização das embalagens dos produtos)

Nome do produto	Lote	Composição		Tempo de presa e de trabalho
AH Plus (Dentsply DeTrey®, Konztanz, Alemanha)	1503000569	Pasta A: Resina epoxi bisfenol - A Resina epoxi bisfenol - F Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Sílica Pigmentos de óxido de ferro	Pasta B: Dibenzildiamino Aminoadamantano Triciclododecano - diamino Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Sílica Óleo de silicone	Tempo de trabalho: 4 Horas a 23°C (73°F – graus Fahrenheit) Tempo de presa: 24 Horas a 37°C (99°F)
MTA Fillapex (Angelus®, Londrina, PR, Brasil)	8288	Pasta A (Base) e Pasta B (Catalisador): Resina salicilato Resina diluente Resina natural Óxido de Bismuto Sílica nanoparticulada Trióxido Agregado Mineral		Tempo de trabalho: 23 minutos

Os dois cimentos endodônticos utilizados para este estudo foram manipulados como indicado anteriormente, sendo preparados três discos para cada grupo, sob condições assépticas em formas cilíndricas com um diâmetro de 5 mm e altura de 2 mm, com uma área de 71 mm² e um volume de 40 mm³ de acordo com a figura 5. Os excessos de material foram removidos com uma espátula esterilizada na altura da manipulação. Os moldes dos discos com os grupos dos cimentos foram colocados durante 24h em incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada a 100% com 5% CO₂ (dióxido de carbono) para presa. Não foram realizados discos para os grupos I, J e K.

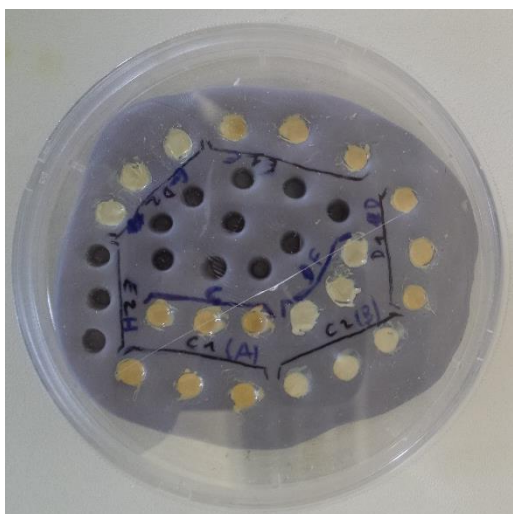


Figura 5 - Molde de fabrico dos discos de cimento

As pastas dos cimentos foram pesadas pasta A (0,1275 g) e pasta B (0,1275 g), a quantidade de clorhexidina da solução *stock* a 20%, por disco foi calculada em função do peso/volume, para o cimento com CHX 1% (12,75 µL), CHX 2% (25,5 µL) e CHX 3% (38,25 µL). A clorhexidina foi adicionada ao lado das pastas antes da manipulação e após a pesagem das mesmas de acordo com a figura 6.



Figura 6 - Exemplo da preparação dos cimentos – AH Plus e Clorhexidina 3%

Após este período de presa, os discos de cada grupo foram colocados em meio de cultura de acordo com ISO 10993-12:2012 e incubados a 37°C durante vários tempos de

incubação/envelhecimento em meio de cultura, dentro de placas de petri. (tabela 3 e figura 7)

Tabela 3 - Tempos de envelhecimento e meio de cultura utilizado para formação dos extratos

Tempos de incubação dos discos e clorhexidina em meio	Meio de cultura utilizado para envelhecimento dos grupos dos discos	Meio de cultura utilizado para os grupos com apenas clorhexidina
1 Hora, 24 Horas e 72 Horas	Completo	Simples

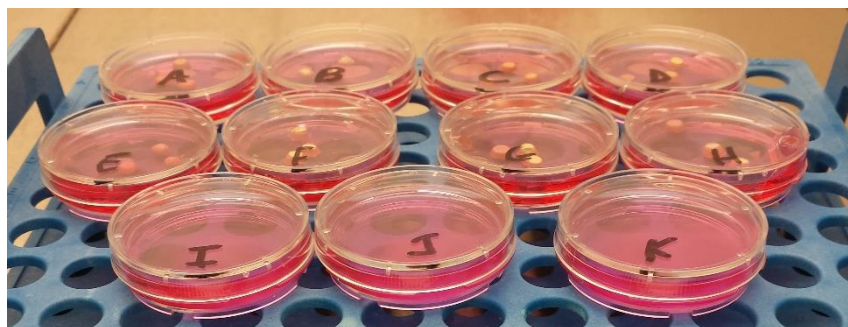


Figura 7 - Grupos dos cimentos e da clorhexidina preparados em meio (ex. Ensaio – 1 hora)

Depois dos respectivos tempos de envelhecimento (1 hora, 24 horas e 72 horas) no meio de cultura indicado na tabela 3, os extratos obtidos (de acordo com ISO 10993-5:4.2.3 e 4.2.3.3), foram filtrados utilizando filtros de 0,45 μm (micrómetros) antes da colocação em contacto com as células.

Foram usadas placas de 96 poços para a realização do ensaio de quantificação da viabilidade celular (figura 8). Foram colocados 200 μ L (microlitros) de cada extrato por poço, sem qualquer diluição, de acordo com o grupo correspondente, como na figura 4. Os controlos correspondiam aos poços com células sem tóxico que correspondiam a 100% de viabilidade celular, e como branco utilizaram-se os poços contendo apenas DMSO (que é o valor da substância utilizada na solubilização dos cristais que se formam no ensaio, ficando apenas registado o valor de absorvância pretendido). Toda a metodologia foi realizada apenas por um único operador.

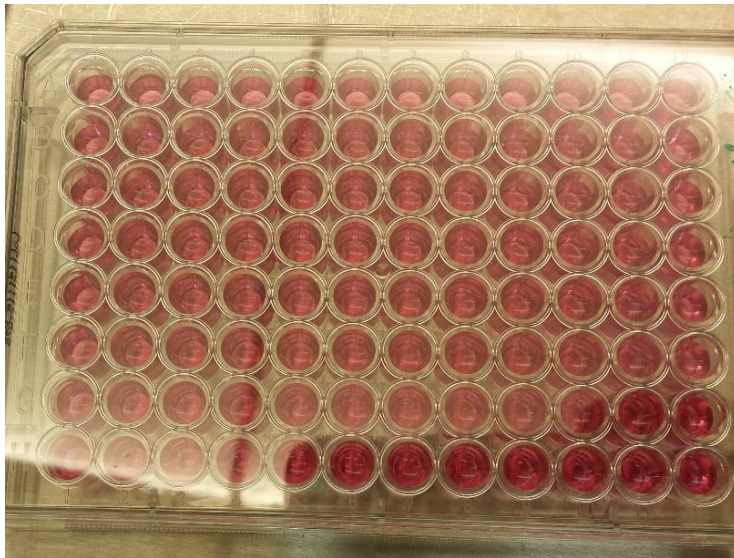


Figura 8 - Placa de 96 poços preparada com as células 3T3 (ex. Ensaio – 1 hora)

2.6.2. Preparação da cultura de fibroblastos 3T3

Linha celular

Para o presente estudo foram utilizadas as células NIH/3T3 (figura 9), que são uma linha celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de *Mus musculus*, ou murganho (rato-doméstico ou camundongo) (ATCC, 2014).

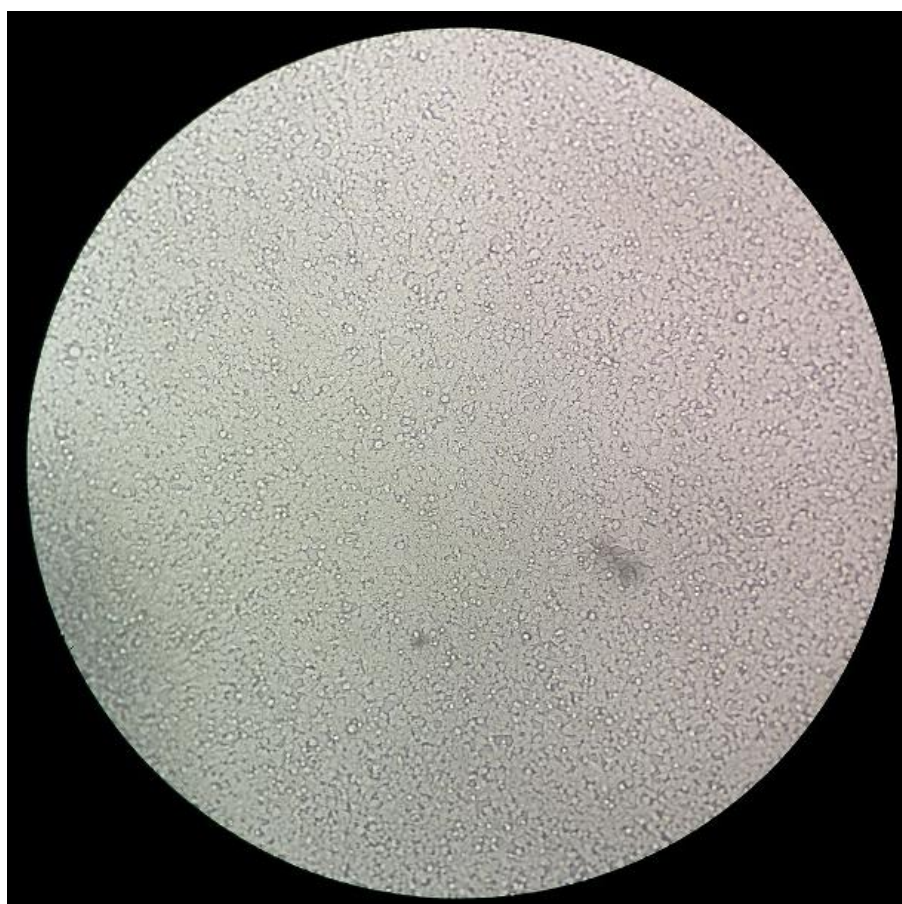


Figura 9 - Imagem das células 3T3 com uma confluência de 80% ao microscópio ótico invertido - objetiva 10x

As culturas de células NIH/3T3 foram mantidas em frasco de cultura de 25 cm² (Sarstedt – figura 10) em meio de cultura a 37°C em incubadora, numa atmosfera humidificada a 100% com 5% CO₂ (ATCC, 2014).

O meio de cultura foi sendo mudado de acordo com a confluência celular, ou seja, a cada três dias. As culturas foram passadas 10 a 15 vezes no máximo, o que significa que durante os ensaios do MTT as células 3T3 se encontravam entre estas passagens.

O meio de cultura utilizado era DMEM completo, constituído por:

- DMEM
- 10% FBS
- 1% MEM 100x
- 1% PNA 100 mM (unidades de milimolar)
- 1% L-Glutamina 200 mM
- 1% Fungizona 250 µg/mL (microgramas/mililitro)
- 1% Solução de Penicilina/Estreptomicina 10.000/10 mg (unidades por miligrama)
- 0,1% Gentamicina 50 mg/mL (miligramas por mililitro)

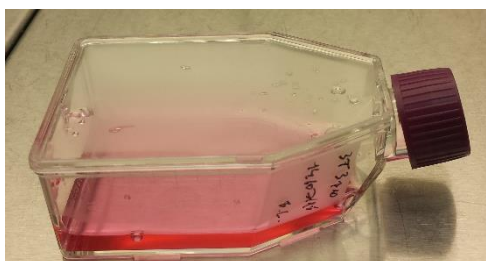


Figura 10 - Frasco de cultura de 25 cm² com células 3T3

A composição do meio simples é a mesma do meio completo, mas sem o soro fetal (FBS).

Os fibroblastos de murganho 3T3 (ATCC) estavam guardados num criotubo a -80°C. As células foram descongeladas em água aquecida a 37°C e pipetadas para o frasco de cultura de 25 cm² juntamente com 6 mL de DMEM completo.

O frasco de cultura foi colocado em incubadora numa atmosfera humidificada a 100% com 5% CO₂. Quando foi atingida confluência de 80% (ou seja, 80% da superfície do frasco de cultura estava coberto pela camada de células em monocamada), foram realizadas as subculturas, iniciando-se a tripsinização. A tripsina é uma enzima que vai quebrar as proteínas que fazem a adesão das células ao frasco de cultura, permitindo dissociar as células. Portanto, em primeiro lugar o meio de cultura é aspirado, de seguida

é feita a lavagem das células com PBS 0,01M (unidades de molar) e depois é adicionada a solução de tripsina 0,25 mg/mL (ATCC, 2014).

O frasco é colocado 2 minutos na incubadora a 37°C permitindo que todas as células se destaquem, o que é confirmado ao microscópio. Após confirmação, é adicionado mais meio de cultura para inativar a tripsina e o conteúdo com a suspensão celular é centrifugado em tubos tipo Falcon cónicos de 15 ml, durante 3 minutos a 1000 rpm.

O sobrenadante é descartado e as células são ressuspensas em meio de cultura completo, seguindo-se a contagem do número de células numa placa de Neubauer utilizando 10 µL desta suspensão à qual se adicionou de 10 µL de uma solução de azul tripan. Após a contagem para o ensaio de MTT semearam-se $1,4 \times 10^4$ células em cada poço, que ficam a incubar 24 horas para adesão aos frascos de cultura antes de serem postos em contacto com os extratos dos cimentos.

Para todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura sem cimentos como para controlo de viabilidade celular de 100%. (Yilmaz *et al.*, 2012)

2.6.3. Determinação da viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade foi feita de acordo com as especificações ISO 10993-5. É medida a viabilidade celular através da medição da atividade metabólica celular.

Como já foi referido, o composto amarelo MTT (Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) é reduzido pelas células viáveis num composto azul-violeta, o formazan (figura 11). O número de células viáveis está diretamente relacionado com a intensidade da cor que é determinada pelo leitor de microplacas após a dissolução do formazan. (ISO 10993-5:2009)

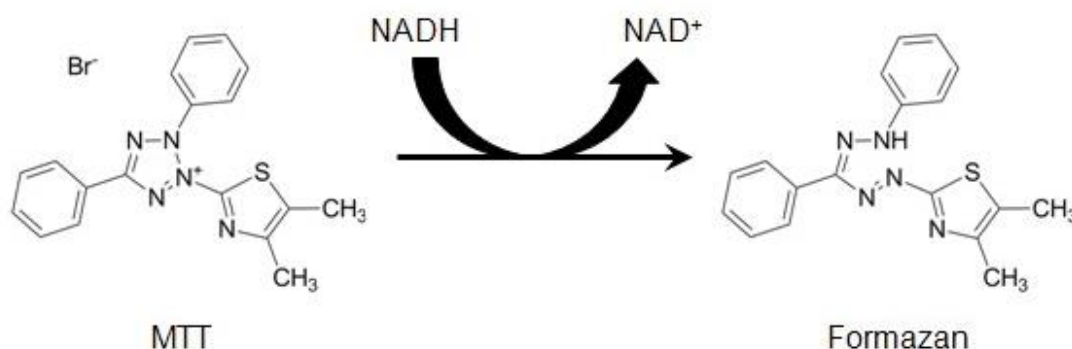


Figura 11 - Redução do MTT em formazan (Riss *et al.*, 2013)

2.6.4. Ensaio do MTT

A toxicidade dos materiais às células NIH/3T3 foi quantificado pela medição da quantidade de Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) reduzido. Após exposição dos extratos dos materiais às células, este ensaio permitiu quantificar o número de células viáveis.

Após um período de incubação de 24 horas dos extratos com as células (de acordo com ISO 10993-5:8.2.9), foram determinados os efeitos citotóxicos nas células quantitativamente (de acordo com ISO 10993-5:8.5). Estes foram removidos dos poços de cada grupo (figura 12). As células foram lavadas com 100 µL de meio de cultura e de seguida foram adicionados 200 µL da solução do MTT (dissolvida em meio de cultura) numa concentração de 0,5 mg/mL. A placa é incubada a 37°C na estufa de CO₂ por um período adicional de 2 horas. Após a remoção da solução do MTT os poços são lavados com PBS 0,01M pH 7,4. É retirado o PBS e secada a placa cuidadosamente. Após os poços estarem bem secos são adicionados 200 µL de DMSO a cada poço para solubilizar os cristais de formazan formados. A redução do MTT foi lida a uma absorvância de 595 nm num leitor de microplacas Model 680. Aos valores obtidos é subtraída a absorvância do DMSO e o resultado normalizado com o valor das culturas de controlo, que correspondem a 100% de viabilidade celular (Chang *et al.*, 2014; Pinna *et al.*, 2008).

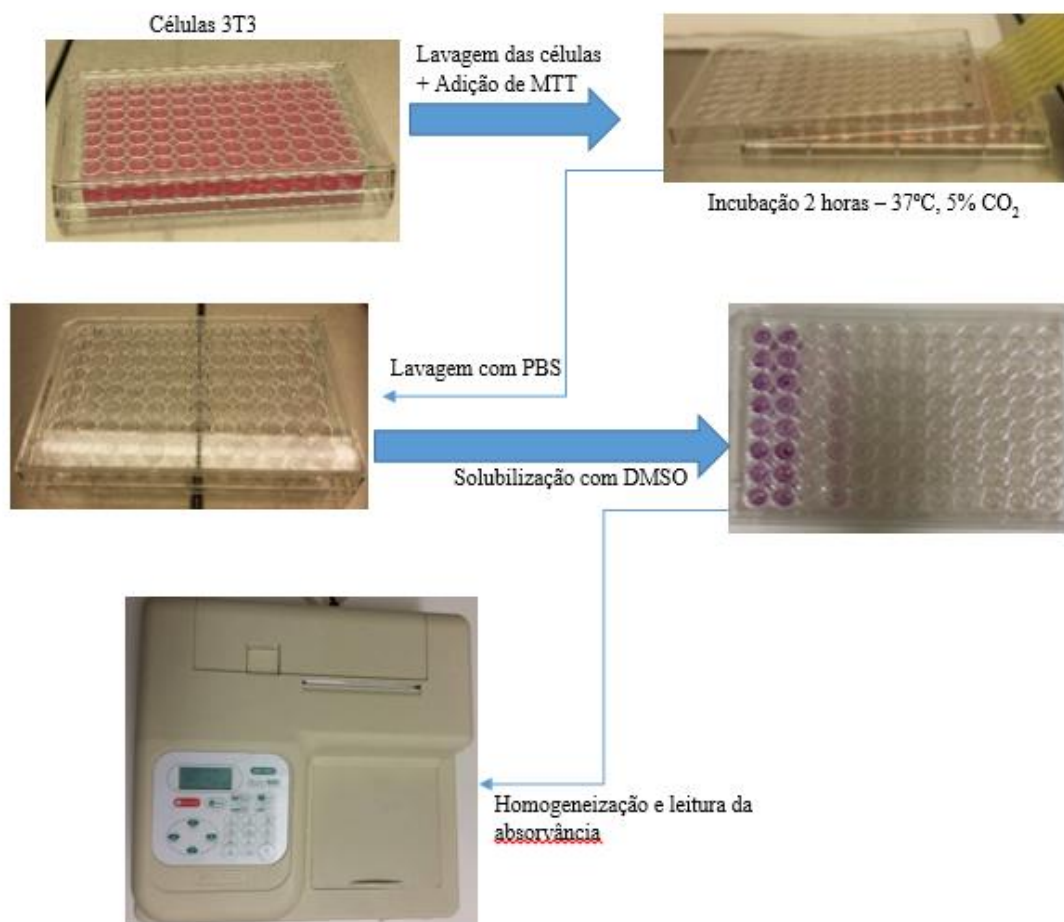


Figura 12 - Esquema ilustrativo do ensaio de redução do MTT

2.7. Critérios de avaliação

A viabilidade celular está associada aos valores de absorvância resultantes da redução do MTT em formazan.

Em todos os ensaios as células 3T3 foram cultivadas no meio de cultura descrito e como controlos de 100% viabilidade celular foram utilizadas culturas celulares postas em contacto com 200 μ L de volume de meio completo, para comparação com a viabilidade das células expostas aos extratos incubados com os diferentes cimentos com e sem clorhexidina.

Foi feita a leitura dos valores do DMSO (branco) a uma absorvância de 595 nm para que se possa fazer a subtração deste valor aos dos valores obtidos nos poços com células. Ou seja, após a leitura dos poços, aos valores obtidos foi subtraída a absorvância do DMSO e o resultado é depois convertido em % de viabilidade celular por comparação entre os valores de absorvância obtidos e o valor de absorvância das culturas de controlo, que correspondem a 100% de viabilidade celular.

Assim, é obtido o valor da viabilidade celular de cada poço e em cada condição testada.

Como referido anteriormente, para todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura completo sem cimentos como para controlo de viabilidade celular de 100% (Yilmaz *et al.*, 2012).

A citotoxicidade foi avaliada com base na viabilidade celular em relação aos controlos, tal como descrito por Dahl, também utilizado noutros estudos (Karapinar-Kazandağ *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013; Zhang, Li, & Peng, 2010):

- Não citotóxico - > 90 % de viabilidade celular;
- Ligeiramente citotóxico - 60-90 % de viabilidade celular;
- Moderadamente citotóxico - 30-59 % de viabilidade celular;
- Fortemente citotóxico - < 30 % de viabilidade celular (Dahl, Frangou-Polyzois, & Polyzois, 2006).

2.8. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram efetuadas no IBM SPSS Statistics (versão 23.0, Nova Iorque, EUA).

Foram verificadas e confirmadas as condições de aplicações dos testes paramétricos, nomeadamente a adequação à normalidade das variáveis contínuas (percentagem de redução do MTT) com o teste Shapiro-Wilk em todos os grupos dos ensaios.

Para verificar se as diferenças entre os grupos testados eram estatisticamente significativos e para comparação dos vários valores foram utilizados os seguintes testes paramétricos: ANOVA one-way, ANOVA one-way com correção de Brown-Forsythe e teste post-hoc Tamhane. O nível de significância considerado foi $p < 0,001$.

3. RESULTADOS

3.1. Análise por grupos

Inicialmente, calculou-se a média da percentagem de viabilidade celular dos vários grupos analisados, ou seja, células expostas a extratos dos 2 cimentos (AH Plus e MTA Fillapex), sem e com clorhexidina obtidos após três tempos de envelhecimento (1 hora, 24 horas e 72 horas).

Como se pode observar na tabela 4 e gráfico 1 o grupo que apresentou a maior percentagem de viabilidade foi o grupo A (cimento AH Plus) com um valor de 75,66%, sendo o grupo J (CHX ao 2%) o grupo com um valor mínimo de viabilidade, com um valor de 6,64%. Houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo A (cimento AH Plus) e o resto dos grupos; o grupo C (cimento AH Plus + CHX 1%) também apresentou diferenças estatisticamente significativas com os outros grupos. Nos restantes grupos ainda que tenham tido diferenças, estas não foram estatisticamente significativas.

Tabela 4 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm DP (representando a percentagem de viabilidade celular), por grupos

Grupo		N	VM (%) \pm DP	Intervalos de confiança (95%)		p*
				Limite superior	Limite inferior	
A	AH Plus	23	75,66 ^a \pm 52,88	98,53	52,79	p < 0,001
B	MTA Fillapex	22	9,94 ^b \pm 3,41	11,45	8,43	
C	AH Plus + CHX 1%	22	40,28 ^{a,b} \pm 39,50	57,79	22,77	
D	AH Plus + CHX 2%	24	24,61 ^b \pm 22,35	34,04	15,17	
E	AH Plus + CHX 3%	23	9,86 ^b \pm 4,08	11,62	8,09	
F	MTA Fillapex + CHX 1%	24	11,22 ^b \pm 4,65	13,19	9,26	
G	MTA Fillapex + CHX 2%	24	14,08 ^b \pm 7,17	17,83	11,78	
H	MTA Fillapex + CHX 3%	24	24,69 ^b \pm 21,62	33,82	15,56	
I	CHX 1%	23	7,21 ^b \pm 3,19	8,59	5,83	
J	CHX 2%	24	6,64 ^b \pm 4,95	8,73	4,55	
K	CHX 3%	21	11,61 ^b \pm 4,66	13,74	9,50	

*ANOVA com correção de Brown-Forsythe.

Comparação múltipla de médias através do teste post-hoc de Tamhane (letras diferentes correspondem a grupos com diferenças estatisticamente significativas) VM = Valores Médios, DP = Desvio Padrão

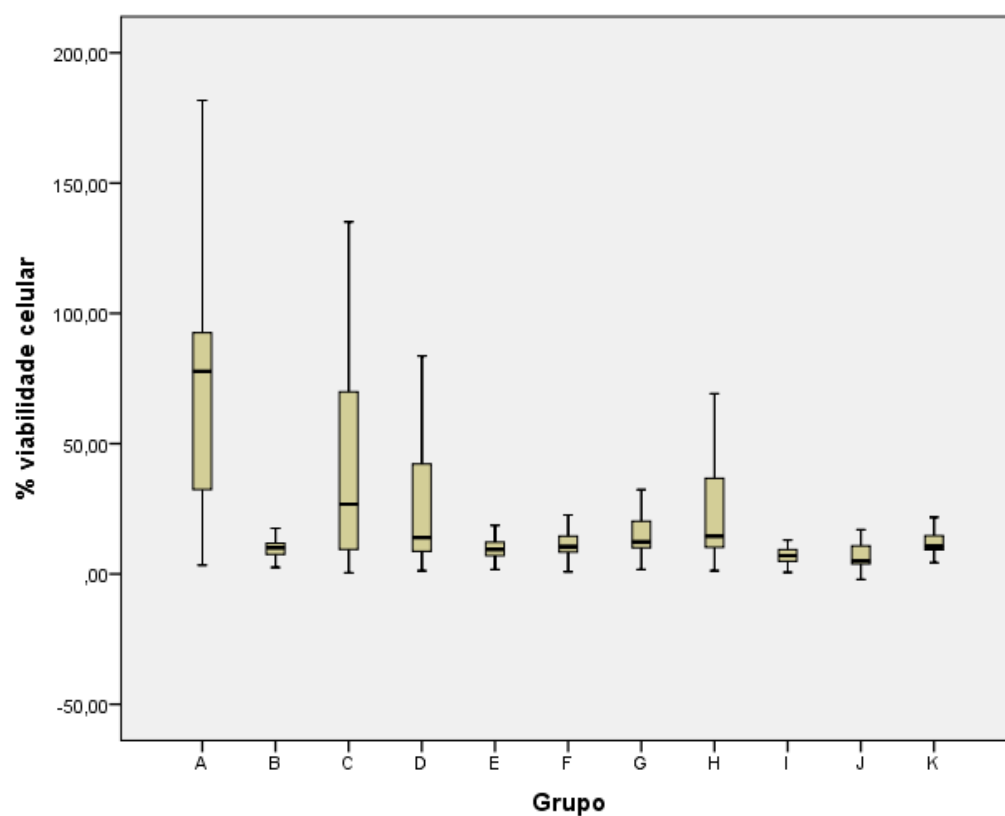


Gráfico 1 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular por grupos

3.2. Análise por tempo de envelhecimento

Calculou-se a percentagem média de viabilidade celular utilizando extratos obtidos após diferentes tempos de envelhecimento.

a) 1 hora

Como se pode observar na tabela 5 e gráfico 2, o grupo que apresentou a maior percentagem de viabilidade celular na 1 hora foi o grupo A (cimento AH Plus) com um valor médio de 148,30%, e o grupo com a menor percentagem de viabilidade celular na 1 hora foi o grupo J (CHX 2%) com um valor médio de 4,61%. Houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo A (cimento AH Plus) e os restantes grupos, exceto com o C (AH Plus + CHX 1%). Em relação aos restantes grupos, os grupos com apenas clorhexidina (I, J, K) não tiveram diferenças estatisticamente significativas entre eles. O grupo B (cimento MTA Fillapex), não teve diferenças para com os grupos E (AH Plus + CHX 3%) e F (MTA Fillapex + CHX 1%). E os grupos D (AH Plus + CHX 2%) e G (MTA Fillapex + CHX 2%) também não tiveram diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Tabela 5 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular), dos grupos com tempo de envelhecimento de 1 hora

Grupo		N	VM (%) \pm DP	Intervalos de confiança (95%)		p*
				Limite superior	Limite inferior	
A	AH Plus	8	148,30 ^a \pm 50,85	190,82	105,78	< 0,001
B	MTA Fillapex	7	9,35 ^b \pm 2,65	11,81	6,90	
C	AH Plus + CHX 1%	8	118,39 ^{a, c} \pm 49,65	159,9	76,88	
D	AH Plus + CHX 2%	8	52,07 ^{c, d} \pm 17,09	66,37	37,79	
E	AH Plus + CHX 3%	8	12,31 ^{b, e} \pm 5,25	16,71	7,92	
F	MTA Fillapex + CHX 1%	8	11,80 ^{b, f} \pm 4,36	15,45	8,15	
G	MTA Fillapex + CHX 2%	8	22,07 ^{d, e, f, g} \pm 6,27	27,32	16,83	
H	MTA Fillapex + CHX 3%	8	51,14 ^{c, g} \pm 17,30	65,61	36,68	
I	CHX 1%	8	7,45 ^b \pm 3,90	10,72	4,19	
J	CHX 2%	5	4,61 ^b \pm 0,54	5,28	3,94	
K	CHX 3%	8	13,92 ^{b, f} \pm 7,43	20,14	7,71	

*ANOVA com correção de Brown-Forsythe.

Comparação múltipla de médias através do teste post-hoc de Tamhane (letras diferentes correspondem a grupos com diferenças estatisticamente significativas) VM = Valores Médios, DP = Desvio Padrão

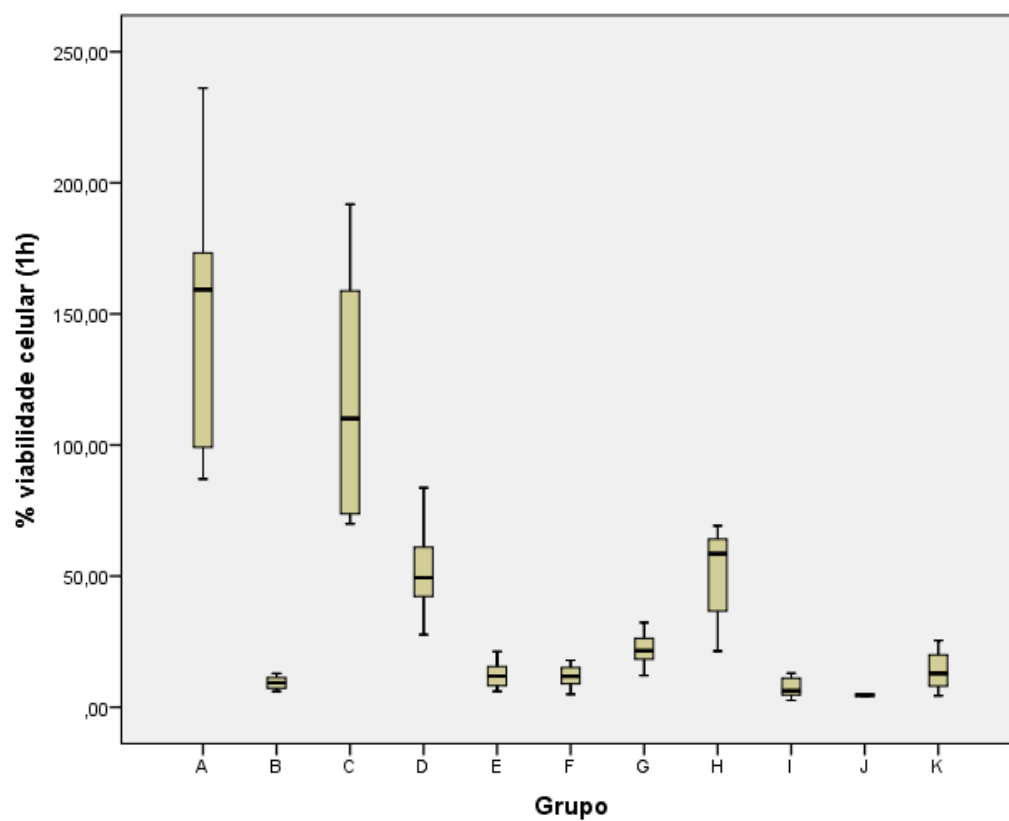


Gráfico 2 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular referentes aos grupos do ensaio com tempo de envelhecimento de 1 hora

b) 24 horas

Como se pode observar na tabela 6 e gráfico 3 o grupo que apresentou a maior percentagem de viabilidade celular nas 24 horas foi o grupo A (cimento AH Plus) com um valor médio de 20,57%, e o grupo com a menor percentagem de viabilidade celular nas 24 horas foi o grupo I (CHX 1%) com um valor médio de 5,56%.

Apesar das diferenças estatisticamente significativas pelo valor de p , não foi possível verificar com os testes post-hoc os grupos responsáveis por estas diferenças.

Tabela 6 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular), dos grupos com tempo de envelhecimento de 24 horas

Grupo		N	VM (%) \pm DP	Intervalos de confiança (95%)		p^*
				Limite superior	Limite inferior	
A	AH Plus	8	20,57 \pm 11,55	30,23	10,91	0,001
B	MTA Fillapex	6	9,65 \pm 1,57	11,31	8,00	
C	AH Plus + CHX 1%	8	8,06 \pm 3,89	11,32	4,81	
D	AH Plus + CHX 2%	8	9,55 \pm 4,77	13,55	5,56	
E	AH Plus + CHX 3%	8	10,16 \pm 4,76	14,15	6,19	
F	MTA Fillapex + CHX 1%	8	10,13 \pm 4,83	14,18	6,09	
G	MTA Fillapex + CHX 2%	6	10,97 \pm 1,41	12,45	9,49	
H	MTA Fillapex + CHX 3%	8	11,65 \pm 5,50	16,26	7,05	
I	CHX 1%	8	5,56 \pm 4,66	9,47	1,66	
J	CHX 2%	8	6,10 \pm 5,65	10,83	1,37	
K	CHX 3%	8	16,99 \pm 10,22	25,54	8,44	

*ANOVA com correção de Brown-Forsythe. VM = Valores Médios, DP = Desvio Padrão

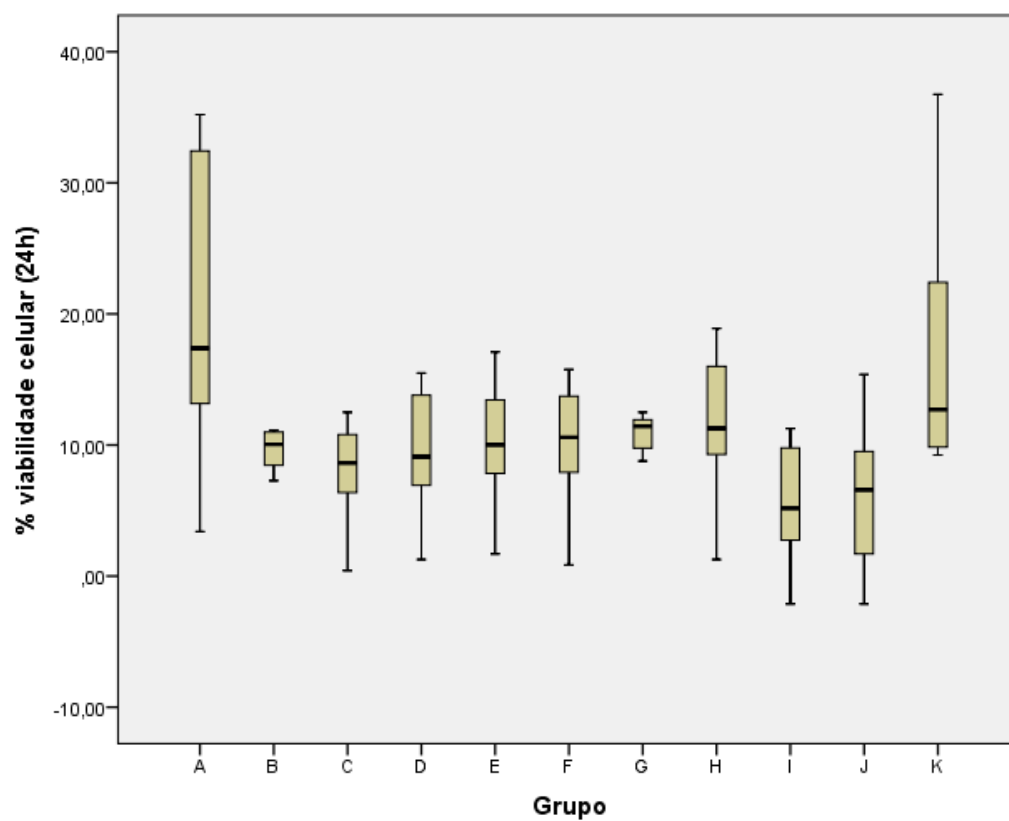


Gráfico 3 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular referentes aos grupos do ensaio com tempo de envelhecimento de 24 horas

c) 72 horas

Como se pode observar na tabela 7 e gráfico 4 o grupo que apresentou a maior percentagem de viabilidade celular nas 72 horas foi o grupo A (cimento AH Plus) com um valor médio de 82,77%, e o grupo com a menor percentagem de viabilidade celular nas 72 horas foi o grupo J (CHX 2%) com um valor médio de 7,26%.

Os resultados às 72 horas tiveram um comportamento semelhante ao que aconteceu no grupo da 1 hora. Houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo A (cimento AH Plus) e o resto dos grupos. Nos restantes grupos ainda que tenham tido diferenças, estas não foram estatisticamente significativas.

Tabela 7 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular), dos grupos com tempo de envelhecimento de 72 horas

Grupo		N	VM (%) \pm DP	Intervalos de confiança (95%)		p*
				Limite superior	Limite inferior	
A	AH Plus	7	82,77 ^a \pm 9,29	91,37	74,18	< 0,001
B	MTA Fillapex	8	12,54 ^{b, c, d} \pm 5,43	17,09	7,99	
C	AH Plus + CHX 1%	8	31,11 ^{b, c} \pm 10,73	40,09	22,14	
D	AH Plus + CHX 2%	8	12,19 ^{b, c, d} \pm 5,30	16,64	7,76	
E	AH Plus + CHX 3%	8	8,51 ^{b, d} \pm 3,39	11,35	5,68	
F	MTA Fillapex + CHX 1%	8	11,74 ^{b, c, d} \pm 5,16	16,06	7,42	
G	MTA Fillapex + CHX 2%	8	11,87 ^{b, c, d} \pm 4,50	15,65	8,11	
H	MTA Fillapex + CHX 3%	8	11,27 ^{b, c, d} \pm 2,50	13,37	9,17	
I	CHX 1%	8	7,43 ^{b, d} \pm 2,06	9,15	5,71	
J	CHX 2%	8	7,26 ^{b, d} \pm 5,24	11,65	2,88	
K	CHX 3%	8	10,91 ^{b, d} \pm 4,54	14,72	7,11	

*ANOVA com correção de Brown-Forsythe.

Comparação múltipla de médias através do teste post-hoc de Tamhane (letras diferentes correspondem a grupos com diferenças estatisticamente significativas) VM = Valores Médios, DP = Desvio Padrão

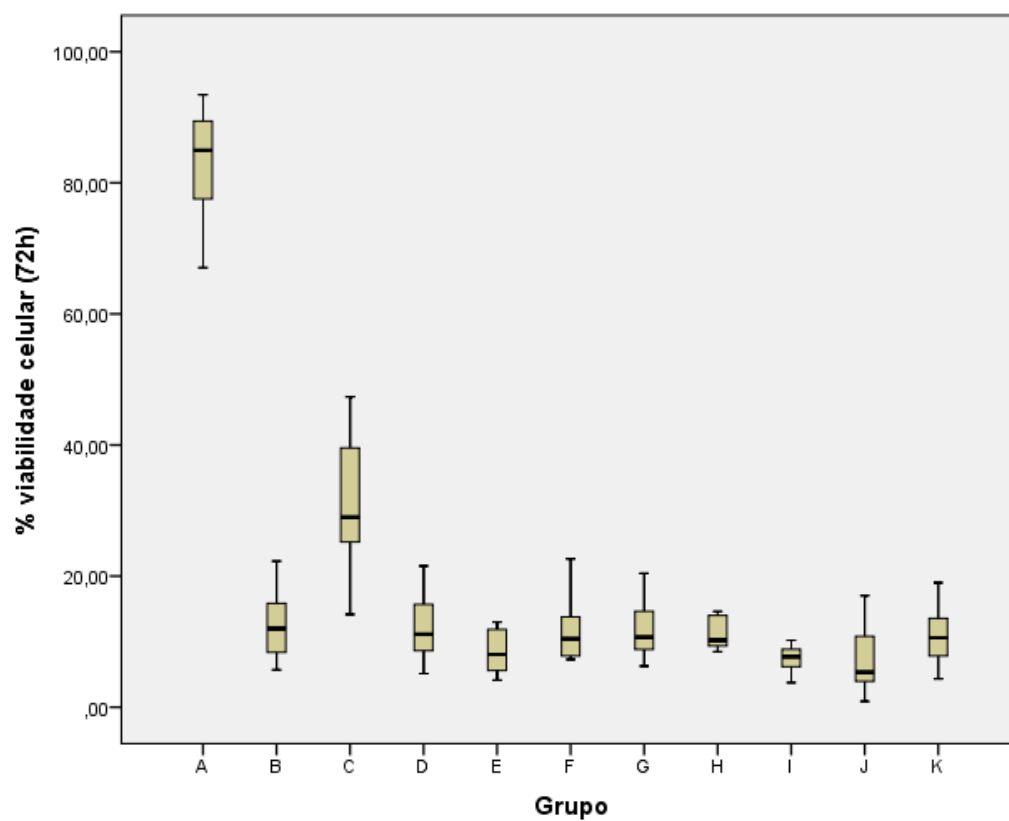


Gráfico 4 - Distribuição das percentagens de viabilidade celular referentes aos grupos do ensaio com tempo de envelhecimento de 72 horas

3.3. Análise por tempos de envelhecimento para cada grupo

Nos grupos do AH Plus e do AH Plus + CHX 1%, houve diferenças estatisticamente significativas ao longo dos três tempos, sendo o menos citotóxico na 1 hora, mais citotóxico às 24 horas e voltando a perder citotoxicidade às 72 horas. Nos grupos AH Plus + CHX 2%, MTA Fillapex + CHX 2% e MTA Fillapex + CHX 3%, houve diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo da 1 hora para as 24 horas e 72 horas, mas não houve diferenças estatisticamente significativas das 24 horas para as 72 horas nestes grupos. Nos grupos MTA Fillapex, AH Plus + CHX 3%, MTA Fillapex + CHX 1% e nos com apenas clorhexidina em qualquer das concentrações (1%, 2% e 3%) não houve diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo. (tabela 8 e gráfico 5)

Tabela 8 - Valores médios da percentagem de redução do MTT (VM) \pm desvio padrão (representando a percentagem de viabilidade celular dos grupos por tempo de envelhecimento).

Grupo	Tempos de envelhecimento	VM (%) \pm DP	**	p*
AH Plus	1 hora	148,30 \pm 50,85	a	$p < 0,001$
	24 horas	20,57 \pm 11,55	b	
	72 horas	82,77 \pm 9,29	c	
MTA Fillapex	1 hora	9,35 \pm 2,65	Não houve diferenças estatisticamente significativas	$p > 0,001$
	24 horas	9,65 \pm 1,57		$p = 0,541$
	72 horas	12,54 \pm 5,43		
AH Plus + CHX 1%	1 hora	118,39 \pm 49,65	a	$p < 0,001$
	24 horas	8,06 \pm 3,89	b	
	72 horas	31,11 \pm 10,73	c	
AH Plus + CHX 2%	1 hora	52,07 \pm 17,09	a	$p < 0,001$
	24 horas	9,55 \pm 4,77	b	
	72 horas	12,19 \pm 5,30	b	
AH Plus + CHX 3%	1 hora	12,31 \pm 5,25	Não houve diferenças estatisticamente significativas	$p > 0,001$
	24 horas	10,16 \pm 4,76		$p = 0,269$
	72 horas	8,51 \pm 3,39		
MTA Fillapex + CHX 1%	1 hora	11,80 \pm 4,36	Não houve diferenças estatisticamente significativas	$p > 0,001$
	24 horas	10,13 \pm 4,83		$p = 0,737$
	72 horas	11,74 \pm 5,16		
MTA Fillapex + CHX 2%	1 hora	22,07 \pm 6,27	a	$p < 0,001$
	24 horas	10,97 \pm 1,41	b	
	72 horas	11,87 \pm 4,50	b	
MTA Fillapex + CHX 3%	1 hora	51,14 \pm 17,30	a	$p < 0,001$
	24 horas	11,65 \pm 5,50	b	
	72 horas	11,27 \pm 2,50	b	
CHX 1%	1 hora	7,45 \pm 3,90	Não houve diferenças estatisticamente significativas	$p > 0,001$
	24 horas	5,56 \pm 4,66		$p = 0,878$
	72 horas	7,43 \pm 2,06		
CHX 2%	1 hora	4,61 \pm 0,54	Não houve diferenças estatisticamente significativas	$p > 0,001$
	24 horas	6,10 \pm 5,65		$p = 0,944$
	72 horas	7,26 \pm 5,24		
CHX 3%	1 hora	13,92 \pm 7,43	Não houve diferenças estatisticamente significativas	$p > 0,001$
	24 horas	16,99 \pm 10,22		$p = 0,320$
	72 horas	10,91 \pm 4,54		

*ANOVA com correção de Brown-Forsythe. **Comparação múltipla de médias através do teste post-hoc de Tamhane (letras diferentes correspondem a grupos com diferenças estatisticamente significativas) VM = Valores Médios, DP = Desvio Padrão

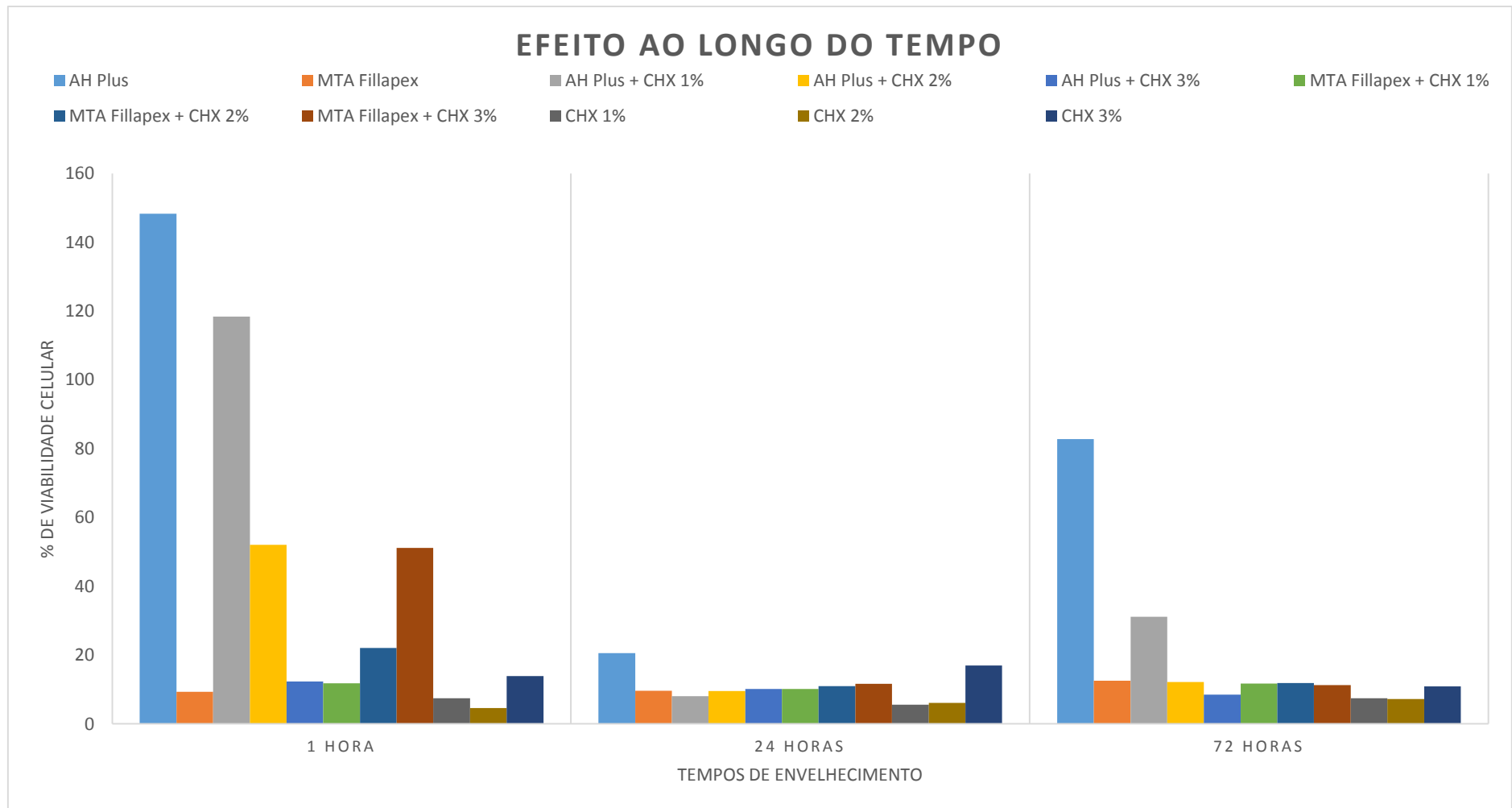


Gráfico 5 - Distribuição das percentagens médias de viabilidade celular referentes aos grupos do estudo ao longo da 1 hora, 24 horas e 72 horas

4. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH Plus e MTA Fillapex modificados com clorhexidina sobre linhas celulares 3T3 de rato através do ensaio do MTT.

A adição de agentes antimicrobianos aos cimentos endodônticos destina-se a melhorar a sua atividade antibacteriana no canal radicular preparado (Duarte *et al.*, 2010; Gjorgievska, Apostolska, Dimkov, Nicholson, & Kaftandzieva, 2013).

A biocompatibilidade dos cimentos endodônticos é de importância primordial, mas varia consideravelmente. Foi relatado que cimentos endodônticos podem provocar efeitos adversos locais e/ou sistêmicos nos tecidos periapicais e osso alveolar devido à liberação de monómeros e/ou outros ingredientes orgânicos e inorgânicos presentes nos cimentos (Yilmaz *et al.*, 2012).

A citotoxicidade de cimentos endodônticos pode causar degeneração celular e atrasar a cicatrização por causa do contato direto de cimentos com os tecidos periapicais (Gandolfi & Prati, 2010; Sousa, Montes, Pascon, Loyola, & Versiani, 2006).

Assim é importante testar laboratorialmente os materiais antes do seu uso clínico e estandardizar os testes utilizados. No nosso estudo a análise da citotoxicidade foi realizada de acordo com a especificação ISO 10993-5:2009 (Silva *et al.*, 2013).

Neste estudo a avaliação da citotoxicidade foi realizada *in vitro*. Uma outra opção seria a realização de estudos *in vivo*. A longo prazo estes estudos são um padrão-ouro para determinar o desempenho clínico, porém estes estudos são incomuns por causa de dois obstáculos principais: eles são impraticáveis por causa do custo e tempo envolvidos, e eles podem levantar limitações éticas (Hanks, Wataha, & Sun, 1996; Onay, Ungor, & Ozdemir, 2007; Sousa *et al.*, 2006).

As principais vantagens dos testes *in vitro* são, a capacidade de controlar o ambiente das células, a sua interface com os materiais e a capacidade de medir a resposta celular em detalhe e com precisão. Devido a estas vantagens, os testes *in vitro* são bem adequados para a identificação de mecanismos de resposta celular. Os testes *in vitro* são também mais rápidos, mais baratos, mais reprodutíveis e mais escaláveis do que outros tipos de testes (Wataha, 2012). No entanto, os testes *in vitro* podem sofrer de uma falta de relevância para o uso clínico de materiais, e esta fraqueza não é trivial (Browne, 1988).

Para uma triagem da citotoxicidade *in vitro*, optámos pelo ensaio do MTT apesar de se poderem usar outros. Os métodos recomendados incluem, contacto direto com as culturas de células, testes dos extratos ou testes de permeabilidade. Também existem, o teste de difusão em ágar, o ensaio do Filtro de difusão e teste de permeabilidade dentinária (Swetha, Mathew, Murthy, Shruthi, & Bhandi, 2015).

É difícil fazer muitas comparações com muitos dos outros estudos semelhantes devido às inúmeras variações introduzidas nos seus protocolos, desde tempos de presa, métodos de medição da citotoxicidade, linha celular utilizada, moldes de fabricação dos discos, mas mais importante que os moldes é o ratio utilizado para a área de superfície dos discos com o volume de meio utilizado, também o contacto direto ou indireto das células com os cimentos é necessário ter em consideração.

Dentro dos cimentos escolhidos, o AH Plus que é um cimento endodôntico à base de resina epóxi, amplamente utilizado em endodontia (Bin *et al.*, 2012), foi selecionado porque vários estudos *in vitro* (Koulaouzidou, Papazisis, Beltes, Geromichalos, & Kortsaris, 1998; Leonardo *et al.*, 2000; Zhang, Shen, Ruse, & Haapasalo, 2009), *in vivo*, e estudos clínicos (Ørstavik, 2005) indicam a sua adequação para terapia endodôntica.

As excelentes propriedades de MTA como boa biocompatibilidade, bioatividade, e osteocondutividade têm incentivado cientistas em todo o mundo para desenvolver outros materiais endodônticos à base de MTA. Recentemente, foram desenvolvidos novos tipos de cimentos contendo MTA e silicato de cálcio (CS) (Chang *et al.*, 2014).

MTA Fillapex foi criado numa tentativa de combinar as propriedades físico-químicas de um cimento endodôntico com as propriedades biológicas de MTA (Scelza, Linhares, Da Silva, Granjeiro, & Alves, 2012).

Após uma revisão bibliográfica sobre o tema, não foram encontradas publicações onde fosse testada a biocompatibilidade ou citotoxicidade destes cimentos endodônticos modificados com clorhexidina. Foram encontrados apenas estudos onde estes cimentos foram comparados (Bin *et al.*, 2012; Scelza *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013), mas nenhum destes seguiu a metodologia utilizada neste trabalho.

Neste estudo foram testados os cimentos após presa de 24 horas, seguindo as instruções fabricante do AH Plus, este tempo também foi utilizado os restantes grupos com ou sem clorhexidina para padronização dos critérios e de forma a assegurar a presa. Este tempo

de 24 horas, também foi utilizado por outros autores (Accardo *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014). Este tempo é alvo de discussão pois tempos diferentes foram utilizados por outros autores, como por exemplo: 3 vezes o tempo de presa indicado pelos fabricantes, de forma a assegurar a presa (Karapinar-Kazandağ *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2015). Porém segundo, um estudo realizado por Balto *et al.* (2004), o tempo de presa não influencia significativamente a citotoxicidade do material.

Embora o teste de citotoxicidade de cimentos recentemente misturados ser relevante, pois é desta forma que são colocados no sistema de canal radicular, também é importante avaliar cimentos durante longos períodos após a presa, pois é provável que, algum tempo após a aplicação clínica, possam ser observadas alterações nos níveis de citotoxicidade após a difusão de componentes tóxicos a partir dos materiais para o ambiente circundante (Silva, Santos, & Zaia, 2013).

Quanto à metodologia de medição da citotoxicidade, o ensaio utilizado foi o do MTT, onde a diminuição do número de células vivas resulta numa diminuição da actividade metabólica. Esta diminuição está directamente relacionada com a quantidade de formazan formado. (ISO 10993-5:2009) A grande velocidade de processamento das amostras também é uma grande vantagem deste método (Mosmann, 1983), que também foi utilizado várias vezes por diversos autores na avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos (Yilmaz *et al.*, 2012). Apesar disso, são vários os ensaios possíveis e muitos outros são usados, como o ensaio XTT (Scelza *et al.*, 2012), medição da libertação de Cr (Gorduysus & Gorduysus, 2014), métodos de coloração celular (Scelza *et al.*, 2012), entre outros. Foi escolhido o ensaio do MTT principalmente pela velocidade de obtenção dos resultados por leitura da absorvância. Outras grandes vantagens deste ensaio são a sua simplicidade, rapidez, precisão e, para além de não requerem radioisótopos (Eldeniz, Mustafa, Ørstavik, & Dahl, 2007; F.-M. Huang, Tai, Chou, & Chang, 2002).

Alguns testes *in vitro* para biocompatibilidade usam a atividade biossintética ou enzimática de células para avaliar a resposta citotóxica. Testes que medem a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) ou a síntese de proteínas são exemplos comuns. Um teste enzimático comumente usado para a citotoxicidade é o teste do MTT, bem como do Nitrozol de tetrazólio (NBT), do Sal 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) e um outro que utiliza tetrazólio solúvel em água (WST), todos estes ensaios são colorimétricos e baseados na formação de diferentes sais de tetrazólio (Ferracane & Mitchell, 2012).

Existem relatos de respostas e sensibilidades diferentes entre o ensaio do XTT e o ensaio do MTT dependente do tipo celular utilizado. Também foram encontradas evidências de que a redução de MTT está associada não só com mitocôndrias, mas também com o citoplasma e com membranas não mitocondriais (Scelza *et al.*, 2012).

A linha celular utilizada foi a das células 3T3, pois são células imortalizadas e são preferidas para testes *in vitro* de citotoxicidade (ISO 10993-5:2009), sendo por isso usadas em outros estudos de citotoxicidade (Silva *et al.*, 2013), ainda assim muitas outras células são usadas nestes tipos de estudos como células humanas do ligamento periodontal (Accardo *et al.*, 2014), fibroblastos de rato L929 (Yilmaz *et al.*, 2012), fibroblastos humanos gengivais (Zhou *et al.*, 2015), fibroblastos de hamster chinês (Bin *et al.*, 2012) entre outras.

A utilização de linhas de células imortalizadas tem como principal vantagem serem facilmente mantidas em cultura. Além disso, a variabilidade através de biópsias é eliminada e é possível uma maior reprodutibilidade (Huang *et al.*, 2002).

Os moldes utilizados para fabricação dos discos foram feitos em formas cilíndricas de Putty, pela facilidade de manipulação, porém são inúmeros os métodos existentes com a função de dar a forma aos discos e definir o seu tamanho como blocos de Teflon cilíndricos (Silva *et al.*, 2013), anéis de Teflon (Karapinar-Kazandağ *et al.*, 2011), moldes de Teflon (Accardo *et al.*, 2014), moldes plásticos não-reativos (Zhou *et al.*, 2015), entre outros.

Foram utilizados para o contacto com as células extratos dos cimentos (Zhou *et al.*, 2015), que é considerado um contacto indireto dos cimentos com as células. Outros autores utilizam o contacto direto através de amostras preparadas logo após a sua mistura (Zhou *et al.*, 2015), porque a extrusão dos cimentos endodônticos para os tecidos periradiculares pode ocorrer, (Karapinar-Kazandağ *et al.*, 2011) sendo portanto efetivamente um contacto direto.

Também são utilizados outros métodos como a aplicação direta dos cimentos nos poços, onde o cimento preenche um terço dos poços de cultura para obter os extratos (Yilmaz *et al.*, 2012).

Segundo Hegde *et al.* (2011), os cimentos endodônticos são inseridos nos canais radiculares logo após a sua mistura, mas mesmo após a presa ainda existe a libertação de

substâncias potencialmente tóxicas que podem entrar em contacto com os tecidos periapicais. Por esta razão, neste estudo, foram utilizados extratos dos cimentos e não foi feito o contacto direto dos cimentos com as células, pois nem sempre este entra em contacto direto com os tecidos periapicais, o que permitiu verificar o potencial citotóxico destas substâncias (Hegde *et al.*, 2011).

O ratio utilizado para a área de superfície das amostras com o volume de meio utilizado foi seguindo as normas com ISO 10993-12 (2012) (Scelza *et al.*, 2012). No entanto outros autores não têm este fator em consideração.

Em ensaios preliminares, para otimizar as condições experimentais deste estudo, verificou-se a formação de um precipitado nos grupos em que a preparação dos extratos foi feita apenas com clorhexidina.

Isto deve-se ao facto do meio de cultura utilizado na altura ser meio completo e este ter nos seus constituintes soro bovino fetal a 10%, tendo sido demonstrado que as proteínas do soro em concentrações de 0,1% a 10% são precipitadas pela clorhexidina (Lessa *et al.*, 2010). Assim sendo, nos grupos de preparação dos extratos com clorhexidina foi utilizado meio de cultura simples.

No nosso estudo a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos AH Plus, MTA Fillapex e CHX com as concentrações de 1, 2 e 3% foi determinada mediante o ensaio de citotoxicidade, o MTT que nos permite determinar valores de viabilidade celular. Este estudo mostrou que todos os grupos estudados apresentam algum grau de citotoxicidade sendo o cimento AH Plus (ligeiramente citotóxico) significativamente menos citotóxico que o cimento MTA Fillapex e a CHX (nas três percentagens estudadas) ambos severamente citotóxicos. Verificou-se que a incorporação de CHX aumenta significativamente a citotoxicidade do cimento AH Plus, mas a 1% foi apenas moderada, passando a severa com 2% e 3%. Em contrapartida, a combinação da CHX com o cimento MTA Fillapex produziu um efeito inverso de tal forma que são menos citotóxicos que quando comparados isoladamente, e essa citotoxicidade foi menor quanto maior for a concentração da CHX mas sem diferenças significativas. Assim observou-se que o MTA Fillapex combinado com CHX ao 3% (24,69%) apresentou idêntica citotoxicidade à combinação AH Plus + CHX 2% (24,61%).

A libertação de formaldeído tem sido apontada como a causa da citotoxicidade de cimentos resinosos (Spångberg, Barbosa, & Lavigne, 1993).

Adicionalmente, o bisfenol-A-diglicidil-éter foi identificado como um componente mutagénico de materiais à base de resina, que também podem ser citotóxicos (Heil, Reifferscheid, Waldmann, Leyhausen, & Geurtsen, 1996).

A citotoxicidade do AH Plus pode ser explicada pelo facto de este ainda apresentar na sua composição uma substância mutagénica, a resina epoxi, a qual também exibe um perfil citotóxico, especialmente em concentrações ligeiramente diluídas (Schweikl, Schmalz, & Spruss, 2001).

Embora o fabricante do cimento AH Plus reivindicar que o referido material não liberta formaldeído como seu precursor AH 26, a sua citotoxicidade pode ser atribuída à quantidade mínima do componente de amina adicionado à composição para acelerar a cura epóxi (F.-M. Huang *et al.*, 2002).

Bin *et al.* (2012) sugerem que os resultados do AH Plus, também podem ser explicados pela variação no tempo de presa, o que por sua vez é influenciado por factores tais como as condições de humidade e temperatura, bem como a remoção dos espécimes.

Também fez um outro estudo que sugere que a maior citotoxicidade do MTA fresco, é devido ao aumento da libertação dos componentes tóxicos do cimento em soluções aquosas, o que prejudicaria a morfologia das células e a sua capacidade de adesão. Segundo Bin *et al.* (2012), o efeito tóxico do cimento de MTA antes de tomar presa pode apenas indicar o mínimo de irritabilidade do material, mesmo quando utilizado para capeamento direto, porque este cimento é aplicado sobre a polpa imediatamente após a manipulação com presa incompleta. Nos resultados de Bin *et al.* (2012), o cimento mais citotóxico foi o MTA Fillapex, que reduziu drasticamente as taxas de sobrevivência de células, mesmo quando eles foram expostos a uma diluição de 1:4. No entanto, observou-se que este cimento desenvolveu o melhor comportamento após 48 horas, mesmo a concentrações diluídas de menos 1:2 e 1:4, onde se pode ver um aumento do nível de viabilidade celular.

O mecanismo pelo qual esta apoptose é desencadeada ainda não é clara, mas quanto maior a concentração de salicilato, maior é a taxa de morte celular (Mahdi, Alkarrawi, Mahdi, Bowen, & Humam, 2006).

Os resultados do presente estudo vão de acordo ao observado noutros, onde a viabilidade celular foi fortemente afetada pelo cimento MTA Fillapex, mesmo utilizando diferentes metodologias (Scelza *et al.*, 2012).

Segundo Silva *et al.* (2013), o efeito citotóxico do MTA Fillapex está relacionado com os seus componentes, como a resina salicilato, resina diluente e a sílica.

Segundo Darvell & Wu (2011), a viabilidade celular depende do tipo de material, o meio de cultura, e tempo de incubação ao qual as células são expostas. Afirmam também, que o silicato de cálcio que é um dos principais componentes do MTA Fillapex, reage com água para formar gel C-S-H que contribui para uma boa biocompatibilidade.

Um estudo de Zhou *et al.* (2013), constatou que o MTA Fillapex produz um pH alcalino, após ter sido misturado de fresco e após presa, o que sugere que o pH não causa diferenças na sua citotoxicidade.

No nosso estudo a citotoxicidade do MTA Fillapex manteve-se ao longo do tempo (1 h, 24h e 72h), o que coincide com estudo anteriores. Num estudo de Borges *et al.* (2012), o MTA Fillapex foi citotóxico durante o período de teste de 4 semanas. Foi especulado que a citotoxicidade inicial é causada por o componente de resina e o efeito de longa duração citotóxica é causada por outras substâncias libertadas a partir do selante, como o chumbo.

Também Silva *et al.*, 2013, com o cimento MTA Fillapex, este mostrou forte citotoxicidade quando as células foram expostas a um extrato do cimento. Esta toxicidade também não diminuiu ao longo dos períodos de tempo testados, sendo a viabilidade das células fortemente afetada. Uma possível explicação para estes resultados é a presença de componentes tóxicos, tais como salicilato de resina, resina de diluição, e sílica na composição do MTA Fillapex.

Adicionalmente, o MTA Fillapex mostrou forte citotoxicidade nos dias 1 e 7 em osteoblastos primários humanos segundo Chang *et al.* (2014).

Num estudo onde foram utilizados vários ensaios, para verificar a citotoxicidade do MTA Fillapex, através da determinação da viabilidade celular, conclui-se que esta foi fortemente afetada em todos os ensaios utilizados (XTT, NR e CVDE) e nos tempos experimentais (Scelza *et al.*, 2012).

A incorporação da CHX nos cimentos endodônticos deve ser explorada, devido à sua importância na capacidade antimicrobiana e já existem dos estudos onde se incorporou a CHX em vários tipos de cimentos utilizados em Medicina Dentária.

Recentemente, foi demonstrado que a adição de antissépticos, dois pertencentes ao grupo amónio quaternário aumentou o efeito antimicrobiano de vários cimentos endodônticos (Gjorgievska *et al.*, 2013).

Por esta razão, a utilização de aditivos antimicrobianos pode ser vantajoso. No entanto, também foi mostrado que a adição de agentes antimicrobianos pode alterar as propriedades físicas de materiais dentários, dependendo da concentração do agente incorporado (Imazato, 2009; Türkün *et al.*, 2008).

Para melhorar a atividade antibacteriana de materiais dentários, tais como o cimento de ionómero de vidro, alguns agentes antimicrobianos de amplo espectro (como a clorhexidina e cetrimida) foram incorporados com sucesso (Ruiz-Linares *et al.*, 2013).

A clorhexidina é um potente antimicrobiano frequentemente utilizado em endodontia (Arias-Moliz, Ferrer-Luque, González-Rodríguez, Valderrama, & Baca, 2010; Mohammadi & Abbott, 2009).

Vianna *et al.* (2004) relatam que a clorhexidina é capaz de inativar muitos micro-organismos endodônticos resistentes em tão pouco como 15 segundos de tempo de contato.

No presente estudo de citotoxicidade verificou-se o distinto comportamento do efeito da incorporação da CHX dependendo da composição dos cimentos testados. Na revisão bibliográfica não encontramos estudos da citotoxicidade de cimentos endodônticos modificados com CHX pelo que não podemos fazer a comparação.

Os tempos de envelhecimento testados também influenciaram os resultados do trabalho. As diferenças entre os grupos foram mais marcadas quanto testados a 1 hora em comparação aos das 24 e 72 horas principalmente pela variação dos resultados obtidos pelo cimento AH Plus que passou de um valor de 148,3% (estimulação do crescimento celular) a 1 hora para 20,7% (fortemente citotóxico) para voltar as 72 horas a 82,7% (ligeiramente citotóxico); o que nos faz supor que é nestas primeiras 24 horas quando ocorre a maior liberação de substâncias citotóxicas do cimento AH Plus (bisfenol-A-diglicidil-éter, formaldeído,...), ou pode ser devido a algum erro durante a manipulação,

por exemplo, após a inversão da placa para retirar a solução do MTT, alguns dos cristais foram perdidos. Talvez, este passo seja uma limitação neste protocolo, que possa ser corrigida com a utilização de uma micropipeta para se retirar a solução nesta fase. Assim, o valor do controlo celular das 24 horas foi demasiado baixo, e inferior aos dos controlos da 1 hora e 72 horas.

O espectrofotómetro necessita de valores do número de células com uma absorvância entre 0,75 – 1,25 de densidade ótica (ATCC, 2014).

Em contrapartida, o tempo de envelhecimento não alterou a citotoxicidade do MTA Fillapex e a CHX nas suas 3 concentrações, mantiveram-se fortemente citotóxicos desde a primeira hora até às 72h, sem diferenças significativas.

Segundo vários estudos, a citotoxicidade das moléculas libertadas pelos cimentos endodônticos aumenta ao longo do tempo (Lee, Wang, Fang, Hsieh, & Lin, 2011; Lin *et al.*, 2004; Oztan, Yilmaz, Kalayci, & Zaimoglu, 2003; Willershausen, Callaway, Briseño, & Willershausen, 2011; Zoufan *et al.*, 2011).

Lee *et al.* (2011) comparou a citotoxicidade de outros cimentos com o AH Plus, utilizou o ensaio do MTT para determinar o efeito citotóxico em fibroblastos 3T3, utilizou as normas ISO na preparação dos extratos tal como neste estudo. Os resultados obtidos após presa do cimento, após um contacto de 24 horas tiveram uma citotoxicidade ligeira (aprox. 80% viabilidade), e neste estudo foi severa. Esta diferença pode ser explicada pelo tempo de presa ter sido de 1 semana.

Em vários estudos, a toxicidade dos cimentos endodônticos vai diminuindo à medida que estes vão tomando presa (Ashraf *et al.*, 2012; Brackett *et al.*, 2010; Brzovic *et al.*, 2009; Camp, Jeansonne, & Lallier, 2003; Eldeniz *et al.*, 2007; Huang, Yang, Li, & Kao, 2002; Zhang *et al.*, 2010).

Noutros estudos, a toxicidade residual dos cimentos endodônticos é reduzida com um aumento do tempo de presa (Azar, Heidari, Bahrami, & Shokri, 2000; Briseno & Willershausen, 1991, 1992; Miletić *et al.*, 2005).

A diferença nos padrões de toxicidade para os vários tempos de eluição pode estar relacionada com o grau de presa. Isso seria refletido na taxa de libertação dos monómeros. Assim, os diferentes tempos dos extratos podem ser importantes para determinar a toxicidade a longo prazo de cimentos endodônticos (Huang *et al.*, 2002).

Neste estudo, dependendo dos cimentos utilizados, a concentração de CHX incorporada afetou a sua toxicidade ao longo do tempo de diferente forma. Deste modo, a diferente concentração da CHX afetou de maneira inversamente proporcional o comportamento citotóxico do cimento AH Plus nos diferentes tempos estudados de tal forma que o aumentar da concentração da CHX diminuiu as diferenças de citotoxicidade entre os três tempos.

Assim tanto o AH Plus isolado, como o AH Plus com a incorporação de CHX 1% tiveram diferenças significativas entre os três tempos de envelhecimento, e obtiveram uma curva evolutiva semelhante ainda que com diferente citotoxicidade de forma significativa. Contudo, quando misturado com CHX a 2%, apenas teve diferenças significativas a diferença entre a 1 hora e as 24 horas, e não houve diferenças significativas entre os três tempos quando incorporada a CHX a 3%.

Com o cimento MTA Fillapex ocorreu o contrário, com o aumento da concentração da CHX apareceram diferenças significativas entre a 1 hora e as 24 horas (porém apenas aconteceu com 2% e 3% e não com 1%). Comprovamos que o efeito citotóxico próprio da CHX interage de forma diferente dependendo da composição do cimento e não é unicamente expressão da sua composição.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no estudo, podemos aceitar a hipótese alternativa, pois há diferenças nas reações de citotoxicidade a nível dos fibroblastos 3T3 quando em contacto com os cimentos AH Plus e MTA Fillapex com ou sem digluconato de clorhexidina a 1%, 2% e a 3%.

Com a exceção do cimento AH Plus e AH Plus com clorhexidina a 1% na 1 hora, todos os grupos apresentaram algum grau de citotoxicidade em todos os tempos, sendo o cimento AH Plus significativamente menos citotóxico que o cimento MTA Fillapex.

A incorporação da clorhexidina aumentou a citotoxicidade do cimento AH Plus de forma significativa (exceção 1% na 1 hora). Porém, as alterações da citotoxicidade produzida pela incorporação da clorhexidina no cimento MTA Fillapex não foram estatisticamente significativas tanto às 24 horas como às 72 horas.

O AH Plus teve por ordem crescente de citotoxicidade os tempos: 1 hora, 72 horas, 24 horas, com diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo. Esta ordem não era a espectável, por isso estes resultados precisam de ser validados por novos ensaios.

As diferenças de citotoxicidade ao longo do tempo do cimento MTA Fillapex, não foram estatisticamente significativas.

Os grupos de cimentos com clorhexidina na 1 hora, apenas o AH Plus com clorhexidina a 1% não foi citotóxico, os restantes neste tempo com clorhexidina foram citotóxicos. Os cimentos com clorhexidina no grupo das 24 horas foram todos citotóxicos.

Nos grupos de cimentos com clorhexidina nas 72 horas, apenas o AH Plus e AH Plus com clorhexidina a 1% diminuíram significativamente a citotoxicidade, em relação às 24 horas, mas continuaram em níveis de citotoxicidade, assim como os restantes grupos.

Os grupos de AH Plus com clorhexidina, a 1% e 2% foram mais citotóxicos às 24 horas, e menos na 1 hora, com 3% não houve diferenças ao longo do tempo.

Os grupos de MTA Fillapex com clorhexidina, a 1% não houve diferenças ao longo do tempo, a 2% foi mais citotóxico às 24 horas, e menos na 1 hora e a 3% foi mais citotóxico às 24 horas, e menos às 72 horas.

Ambos os cimentos estudados são citotóxicos, mas o cimento MTA Fillapex é significativamente mais citotóxico que o AH Plus. A severa citotoxicidade do MTA Fillapex mantém-se durante o tempo de estudo, no entanto a do AH Plus após um aumento da citotoxicidade inicial, a partir das 24 horas diminuiu. A incorporação da clorhexidina

aumentou a citotoxicidade do AH Plus e de forma progressiva ao aumentar sua citotoxicidade mais do que no MTA Fillapex com clorhexidina.

Mais estudos devem ser realizados de forma a avaliar se de facto a adição de novos produtos aos cimentos, trazem de facto vantagens, sendo importante avaliar todas as características físicas ou químicas destes cimentos. Os resultados obtidos neste estudo são principalmente uma indicação do potencial de toxicidade e não indicam necessariamente, que a adição da clorhexidina não é de facto adequada para uma dada aplicação clínica.

6. BIBLIOGRAFIA

- Accardo, C., Himel, V. T., & Lallier, T. E. (2014). A novel GuttaFlow sealer supports cell survival and attachment. *Journal of Endodontics*, 40(2), 231–234. doi:10.1016/j.joen.2013.08.029
- Arias-Moliz, M. T., Ferrer-Luque, C. M., González-Rodríguez, M. P., Valderrama, M. J., & Baca, P. (2010). Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *Journal of Endodontics*, 36(1), 87–90. doi:10.1016/j.joen.2009.10.013
- Ashraf, H., Moradimajd, N., Mozayeni, M. A., Dianat, O., Mahjour, F., & Yadegari, Z. (2012). Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line. *Dental Research Journal*, 9(5), 549–53. doi:10.4103/1735-3327.104872
- ATCC. (2014). Manassas, Virginia. [Consultado em 05.03.2015]. Disponível em <http://www.atcc.org>.
- Azar, N. G., Heidari, M., Bahrami, Z. S., & Shokri, F. (2000). In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *Journal of Endodontics*, 26(8), 462–465. doi:10.1097/00004770-200008000-00008
- Bailón-Sánchez, M. E., Baca, P., Ruiz-Linares, M., & Ferrer-Luque, C. M. (2014). Antibacterial and anti-biofilm activity of AH plus with chlorhexidine and cetrimide. *Journal of Endodontics*, 40(7), 977–981. doi:10.1016/j.joen.2013.11.020
- Balto, H. A. (2004). Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *Journal of Endodontics*, 30(1), 25–9. doi:10.1097/00004770-200401000-00005
- Basrani, B. (2005). Chlorhexidine Gluconate. *Australian Endodontic Journal*, 31(2), 48–52. doi:10.1111/j.1747-4477.2005.tb00221.x
- Berman, L. H., & Hartwell, G. R. (2011). Diagnosis. In K. M. Hargreaves & S. Cohen (Eds.), *Cohen's Pathways of the Pulp* (10th ed., pp. 2–39). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Bin, C. V., Valera, M. C., Camargo, S. E. a, Rabelo, S. B., Silva, G. O., Balducci, I., & Camargo, C. H. R. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 38(4), 495–500. doi:10.1016/j.joen.2011.11.003
- Borges, R. P., Sousa-Neto, M. D., Versiani, M. A., Rached-Júnior, F. A., De-Deus, G., Miranda, C. E. S., & Pécora, J. D. (2012). Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International Endodontic Journal*, 45(5), 419–428. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01992.x

- Brackett, M. G., Messer, R. L. W., Lockwood, P. E., Bryan, T. E., Lewis, J. B., Bouillaguet, S., & Wataha, J. C. (2010). Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 95B(2), 380–386. doi:10.1002/jbm.b.31727
- Briseno, B. M., & Willershausen, B. (1991). Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II . Silicone- and resin-based sealers. *Journal of Endodontics*, 17(11), 537–540. doi:10.1016/s0099-2399(06)81718-8
- Briseno, B. M., & Willershausen, B. (1992). Root canal sealer cytotoxicity with human gingival fibroblasts. III. Calcium hydroxide-based sealers. *Journal of Endodontics*, 18(3), 110–113. doi:10.1016/s0099-2399(06)81309-9.
- Browne, R. M. (1988). The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials- does it have a role? *International Endodontic Journal*, 21(2), 50–58. doi:10.1111/j.1365-2591.1988.tb00955.x
- Brzovic, V., Miletic, I., Zeljezic, D., Mladinic, M., Kasuba, V., Ramic, S., & Anic, I. (2009). In vitro genotoxicity of root canal sealers. *International Endodontic Journal*, 42(3), 253–263. doi:10.1111/j.1365-2591.2008.01510.x
- Camp, M. a, Jeansonne, B. G., & Lallier, T. (2003). Adhesion of human fibroblasts to root-end-filling materials. *Journal of Endodontics*, 29(9), 602–7. doi:10.1097/00004770-200309000-00014
- Chang, S.-W., Lee, S.-Y., Kang, S.-K., Kum, K.-Y., & Kim, E.-C. (2014). In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin Apatite Root Sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP root canal sealer. *Journal of Endodontics*, 40(10), 1642–1648. doi:10.1016/j.joen.2014.04.006
- Dahl, J. E., Frangou-Polyzois, M. J., & Polyzois, G. L. (2006). In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*, 23(1), 17–22. doi:10.1111/j.1741-2358.2006.00103.x
- Darvell, B. W., & Wu, R. C. T. (2011). “MTA”—An hydraulic silicate cement: Review update and setting reaction. *Dental Materials*, 27(5), 407–422. doi:10.1016/j.dental.2011.02.001
- De Souza Costa, C. A., Hebling, J., Scheffel, D. L. S., Soares, D. G. S., Basso, F. G., & Ribeiro, A. P. D. (2014). Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dental Materials*, 30(7), 769–784. doi:10.1016/j.dental.2014.04.010
- Duarte, M. A. H., Ordinola-Zapata, R., Bernardes, R. A., Bramante, C. M., Bernardineli, N., Garcia, R. B., & de Moraes, I. G. (2010). Influence of Calcium Hydroxide association on the physical properties of AH Plus. *Journal of Endodontics*, 36(6), 1048–1051. doi:10.1016/j.joen.2010.02.007

- Eldeniz, A. U., Mustafa, K., Ørstavik, D., & Dahl, J. E. (2007). Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International Endodontic Journal*, 40(5), 329–337. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01211.x
- Estrutura molecular do digluconato de clorhexidina. (n.d.). Retrieved March 5, 2015, from <http://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/191360.png>
- European Society of Endodontology. (2006). Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *International Endodontic Journal*, 39, 921–930. doi:10.1111/j.1365-2591.2006.01180.x
- Ferracane, J. L., & Mitchell, J. C. (2012). Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials. In R. L. Sakaguchi & J. M. Powers (Eds.), *Craig's Restorative dental materials* (13th ed., pp. 109–133). Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Gandolfi, M. G., & Prati, C. (2010). MTA and F-doped MTA cements used as sealers with warm gutta-percha. Long-term study of sealing ability. *International Endodontic Journal*, 43(10), 889–901. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01763.x
- Gjorgievska, E., Apostolska, S., Dimkov, A., Nicholson, J. W., & Kaftandzieva, A. (2013). Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontic sealers. *Dental Materials*, 29(3), e29–e34. doi:10.1016/j.dental.2012.10.002
- Glickman, G. N., & Vogt, M. W. (2011). Preparation for Treatment. In K. M. Hargreaves & S. Cohen (Eds.), *Cohen's Pathways of the Pulp* (10th ed., pp. 88–123). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Gomes, B. P. F. A., Vianna, M. E., Zaia, A. A., Almeida, J. F. A., Souza-Filho, F. J., & Ferraz, C. C. R. (2013). Chlorhexidine in endodontics. *Brazilian Dental Journal*, 24(2), 89–102. doi:10.1590/0103-6440201302188
- Gonçalves, N. M. B. (2015). *Estudo in vitro da capacidade antimicrobiana de dois cimentos endodônticos modificados com clorhexidina mediante teste de contacto direto*. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Gorduysus, M. O., & Gorduysus, M. (2014). Cytotoxicity of two epoxy resin based rootcanal sealers using the 51 Cr-release method. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy*, 1(4), 1–3. doi:10.15406/jdhodt.2014.01.00020
- Grossman, L., Oliet, S., & Rio, C. Del. (1988). *Endodontic practice* (11th ed.). Philadelphia, PA, USA: Lea & Febiger.
- Hanks, C. T., Wataha, J. C., & Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: A review. *Dental Materials*, 12(3), 186–193. doi:10.1016/S0109-5641(96)80020-0

- Hegde, M. N., Rodrigues, J. C., Kumari, S., & Hegde, N. D. (2011). Toxicity evaluation of root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Endodontology*, 23(1), 42–48.
- Heil, J., Reifferscheid, G., Waldmann, P., Leyhausen, G., & Geurtsen, W. (1996). Genotoxicity of dental materials. *Mutation Research*, 368(3-4), 181–94. doi:10.1016/S0165-1218(96)90060-9
- Holland, R., de Souza, V., Nery, M. J., Otoboni Filho, J. A., Bernabé, P. F., & Dezan Júnior, E. (1999). Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*, 25(3), 161–166. doi:10.1016/s0099-2399(99)80134-4
- Huang, F.-M., Tai, K.-W., Chou, M.-Y., & Chang, Y.-C. (2002). Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal*, 35(2), 153–158. doi:10.1046/j.1365-2591.2002.00459.x
- Huang, T. H., Yang, J. J., Li, H., & Kao, C. T. (2002). The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials*, 23(1), 77–83. doi:10.1016/S0142-9612(01)00081-3
- Imazato, S. (2009). Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dental Materials Journal*, 28(1), 11–19. doi:10.4012/dmj.28.11
- ISO 10993-12:2012. Biological evaluation of medical devices - part 12: Sample preparation and reference materials. (2012). Retrieved from <http://www.iso.org>
- ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. (2009). Retrieved from <http://www.iso.org>
- Johnson, W. T., & C. Kulild, J. (2011). Obturation of the Cleaned and Shaped Root Canal System. In K. M. Hargreaves & S. Cohen (Eds.), *Cohen's Pathways of the Pulp* (10th ed., pp. 349–388). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Takehashi, S., Stanley, H. R., & Fitzgerald, R. J. (1966). The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *Journal - Southern California Dental Association*, 34(9), 449–451. doi:10.1016/0030-4220(65)90166-0
- Karapinar-Kazandağ, M., Bayrak, Ö. F., Yalvaç, M. E., Ersev, H., Tanalp, J., Şahin, F., & Bayirli, G. (2011). Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 44(7), 626–634. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01863.x
- Koulaouzidou, E. a, Papazisis, K. T., Beltes, P., Geromichalos, G. D., & Kortsaris, a H. (1998). Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endodontics & Dental Traumatology*, 14(4), 182–185. doi:10.1111/j.1600-9657.1998.tb00834.x

- Krautheim, A. B., Jermann, T. H. M., & Bircher, A. J. (2004). Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis*, 50, 113–116. doi:10.1111/j.0105-1873.2004.00308.x
- Lee, B.-S., Wang, C.-Y., Fang, Y.-Y., Hsieh, K.-H., & Lin, C.-P. (2011). A novel urethane acrylate-based root canal sealer with improved degree of conversion, cytotoxicity, bond strengths, solubility, and dimensional stability. *Journal of Endodontics*, 37(2), 246–249. doi:10.1016/j.joen.2010.11.008
- Leonardo, M. R., da Silva, L. A., Tanomaru Filho, M., Bonifácio, K. C., & Ito, I. Y. (2000). In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *Journal of Endodontics*, 26(7), 391–394. doi:10.1097/00004770-200007000-00003
- Leonardo, M. R., Filho, M. T., Silva, L. A. B., Filho, P. N., Bonifácio, K. C., & Ito, I. Y. (1999). In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics*, 25(3), 167–171. doi:10.1016/S0099-2399(99)80135-6
- Lessa, F. C. R., Aranha, A. M. F., Nogueira, I., Giro, E. M. A., Hebling, J., & Costa, C. A. D. S. (2010). Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *Journal of Applied Oral Science*, 18(1), 50–58. doi:10.1590/S1678-77572010000100010
- Lima, K. C., Fava, L. R., & Siqueira, J. F. (2001). Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *Journal of Endodontics*, 27(10), 616–619. doi:10.1097/00004770-200110000-00004
- Limkangwalmongkol, S., Abbott, P. V., & Sandler, A. B. (1992). Apical dye penetration with four root canal sealers and gutta-percha using longitudinal sectioning. *Journal of Endodontics*, 18(11), 535–539. doi:10.1016/S0099-2399(06)81209-4
- Lin, C.-P., Chen, Y.-J., Lee, Y.-L., Wang, J.-S., Chang, M.-C., Lan, W.-H., ... Jeng, J.-H. (2004). Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 71B(2), 429–440. doi:10.1002/jbm.b.30107
- Löe, H., & Rindom Schiött, C. (1970). The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*. doi:10.1111/j.1600-0765.1970.tb00696.x
- Löe, H., Rindom Schiött, C., Glavind, L., & Karring, T. (1976). Two years oral use of chlorhexidine in man. *Journal of Periodontal Research*, 11(3), 135–144. doi:10.1111/j.1600-0765.1976.tb00061.x
- Lovschall, H., Eiskjaer, M., & Arenholt-Bindslev, D. (2002). Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicology in Vitro*, 16, 63–69. doi:10.1016/S0887-2333(01)00093-5

- Mahdi, J. G., Alkarrawi, M. A., Mahdi, A. J., Bowen, I. D., & Humam, D. (2006). Calcium salicylate-mediated apoptosis in human HT-1080 fibrosarcoma cells. *Cell Proliferation*, 39(4), 249–60. doi:10.1111/j.1365-2184.2006.00390.x
- Metzger, Z., Basrani, B., & Goodis, H. E. (2011). Instruments, Materials and Devices. In K. M. Hargreaves & S. Cohen (Eds.), *Cohen's Pathways of the Pulp* (10th ed., pp. 223–282). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Miletić, I., Devčić, N., Anić, I., Borčić, J., Karlović, Z., & Osmak, M. (2005). The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *Journal of Endodontics*, 31(4), 307–9. doi:10.1097/01.don.0000140570.95688.ee
- Mohammadi, Z., & Abbott, P. V. (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal*, 42(4), 288–302. doi:10.1111/j.1365-2591.2008.01540.x
- Möller, A. J. R., Fabricius, L., Dahlén, G., Ohman, A. E., & Heyden, G. (1981). Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 89(6), 475–484. doi:10.1111/j.1600-0722.1981.tb01711.x
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Onay, E. O., Ungor, M., & Ozdemir, B. H. (2007). In vivo evaluation of the biocompatibility of a new resin-based obturation system. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 104(3), e60–e66. doi:10.1016/j.tripleo.2007.03.006
- Ørstavik, D. (2005). Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics*, 12(3), 25–38. doi:10.1111/j.1601-1546.2005.00197.x
- Osorio, R. M., Hefti, A., Vertucci, F. J., & Shawley, a L. (1998). Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontics*, 24(2), 91–96. doi:10.1016/S0099-2399(98)80084-8
- Oztan, M. D., Yilmaz, S., Kalayci, A., & Zaimoglu, L. (2003). A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. *Journal of Oral Rehabilitation*, 30, 426–429. doi:10.1046/j.1365-2842.2003.01053.x
- Pinna, L., Brackett, M. G., Lockwood, P. E., Huffman, B. P., Mai, S., Cotti, E., ... Tay, F. R. (2008). In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer. *Journal of Endodontics*, 34(9), 1085–1088. doi:10.1016/j.joen.2008.06.020
- Ribeiro, D. A., Scolastici, C., Lima, P. L. A. de, Marques, M. E. A., & Salvadori, D. M. F. (2005). Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surgery, Oral*

- Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 99(5), 637–640.
doi:10.1016/j.tripleo.2004.07.010
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. In G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, ... O. McM (Eds.), *Assay Guidance Manual* (pp. 1–23). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Ruiz-Linares, M., Bailón-Sánchez, M. E., Baca, P., Valderrama, M., & Ferrer-Luque, C. M. (2013). Physical properties of AH Plus with chlorhexidine and cetrimide. *Journal of Endodontics*, 39(12), 1611–1614. doi:10.1016/j.joen.2013.08.002
- Scelza, M. Z., Linhares, A. B., Da Silva, L. E., Granjeiro, J. M., & Alves, G. G. (2012). A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *International Endodontic Journal*, 45(1), 12–18. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01941.x
- Schweikl, H., Schmalz, G., & Spruss, T. (2001). The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *Journal of Dental Research*, 80(7), 1615–1620. doi:10.1177/00220345010800070401
- Silva, E. J. N. L. da, Santos, C. C., & Zaia, A. A. (2013). Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *Journal of Applied Oral Science*, 21(1), 43–47. doi:10.1590/1678-7757201302304
- Silva, E. J. N. L., Rosa, T. P., Herrera, D. R., Jacinto, R. C., Gomes, B. P. F. a, & Zaia, A. a. (2013). Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA fillapex. *Journal of Endodontics*, 39(2), 274–277. doi:10.1016/j.joen.2012.06.030
- Siqueira, J. F., & de Uzeda, M. (1997). Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics*, 23(3), 167–169. doi:10.1016/S0099-2399(97)80268-3
- Sousa, C. J. A., Montes, C. R. M., Pascon, E. A., Loyola, A. M., & Versiani, M. A. (2006). Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *Journal of Endodontics*, 32(7), 656–662. doi:10.1016/j.joen.2005.12.003
- Spångberg, L. S. W., Barbosa, S. V., & Lavigne, G. D. (1993). AH26 releases formaldehyde. *Journal of Endodontics*, 19(12), 596–598. doi:10.1016/S0099-2399(06)80272-4
- Swetha, B., Mathew, S., Murthy, B. V. S., Shruthi, N., & Bhandi, S. H. (2015). Determination of biocompatibility : A review. *International Dental & Medical Journal of Advanced Research*, 1, 1–6. doi:10.15713/ins.idmjar.2

- Türkün, L. S., Türkün, M., Ertuğrul, F., Ateş, M., & Brugger, S. (2008). Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 20(1), 29–45. doi:10.1111/j.1708-8240.2008.00146.x
- Tüzüner, T., Kuşgöz, A., Er, K., Taşdemir, T., Buruk, K., & Kemer, B. (2011). Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 23(1), 46–55. doi:10.1111/j.1708-8240.2010.00385.x
- Vertucci, F. J., & Haddix, J. E. (2011). Tooth Morphology and Access Cavity Preparation. In K. M. Hargreaves & S. Cohen (Eds.), *Cohen's Pathways of the Pulp* (10th ed., pp. 136–222). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Vianna, M. E., Gomes, B. P. F. A., Berber, V. B., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., & de Souza-Filho, F. J. (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97(1), 79–84. doi:10.1016/S1079-2104(03)00360-3
- Wataha, J. C. (2012). Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials*, 28(1), 23–40. doi:10.1016/j.dental.2011.08.595
- Willershausen, I., Callaway, A., Briseño, B., & Willershausen, B. (2011). In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head & Face Medicine*, 7, 15. doi:10.1186/1746-160X-7-15
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
- Yilmaz, Z., Dogan, A. L., Ozdemir, O., & Serper, A. (2012). Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dental Materials Journal*, 31(6), 1028–1032. doi:10.4012/dmj.2012-172
- Zhang, H., Shen, Y., Ruse, N. D., & Haapasalo, M. (2009). Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 35(7), 1051–1055. doi:10.1016/j.joen.2009.04.022
- Zhang, W., Li, Z., & Peng, B. (2010). Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *International Endodontic Journal*, 43(9), 769–774. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01733.x
- Zhou, H., Du, T., Shen, Y., Wang, Z., Zheng, Y., & Haapasalo, M. (2015). In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, 41(1), 56–61. doi:10.1016/j.joen.2014.09.012
- Zhou, H., Shen, Y., Zheng, W., Li, L., Zheng, Y., & Haapasalo, M. (2013). Physical properties of 5 root canal sealers. *Journal of Endodontics*, 39(10), 1281–1286. doi:10.1016/j.joen.2013.06.012

Zoufan, K., Jiang, J., Komabayashi, T., Wang, Y. H., Safavi, K. E., & Zhu, Q. (2011). Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 112(5), 657–661. doi:10.1016/j.tripleo.2011.03.050

7. ANEXOS



6

Ex.mo Senhor

Bernardo Maria B. Nicolau e Lucas


Monte de Caparica, 24 de março de 2015

Ex.mo Senhor,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "*Estudo in vitro comparativo de citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos modificados com clorexidina*", foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Prof.^a Doutora  Maria Fernanda de Mesquita

c.c. – Prof. Doutor Diogo Gonzalez